

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 308 165

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12N 1/20* (2006.01)  
*A61K 35/741* (2015.01)  
*A61K 47/00* (2006.01)  
*A23L 33/135* (2016.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-282**  
(22) Přihlášeno: **12.06.2018**  
(40) Zveřejněno: **05.02.2020**  
**(Věstník č. 6/2020)**  
(47) Uděleno: **27.12.2019**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **05.02.2020**  
**(Věstník č. 6/2020)**

(56) Relevantní dokumenty:  
SUGIYARTONO et al.: „Physical characteristic and viability of Lactobacillus acidophilus microparticle using HPMC K100LV and HPMC K4M as matrices,“ International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 6, suppl. 2, 2014, str. 296 – 298, ISSN 0975-1491; GROSSOVA M. et al.: „Probiotic biofilm on carrier surface: promising application for food industry,“ Acta Alimentaria, vol. 46, no. 4, 2017, str. 439 – 448, ISSN 0139-3006.  
US 2018 000 878; DE 202 013 103 204 U; CZ 303 986.

(73) Majitel patentu:  
Pharmaceutical Biotechnology s.r.o., Praha 2,  
Vinohrady, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Petr Ryšávka, Nemojany, CZ

(74) Zástupce:  
Kania, Sedlák, Smola patentová a známková  
kancelář, Mgr. Martina Dvořáková, Mendlovo  
náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:  
**Nosič určený ke kultivaci probiotických kultur, kompozice, která takovýto nosič obsahuje**

(57) Anotace:  
Nosič určený ke kultivaci probiotických kultur, který obsahuje koloidní SiO<sub>2</sub>, prebiotickou složku a hydroxypropylmethylcelulózu. Kompozice, která obsahuje alespoň jednu probiotickou kulturu adheřovanou na takovýto nosič, přičemž probiotická kultura je alespoň v iniciačním stádiu tvorby biofilmu.

## Nosič určený ke kultivaci probiotických kultur, kompozice, která takovýto nosič obsahuje

### Oblast techniky

5

Vynález se týká nosiče určeného ke kultivaci probiotických kultur, kompozice, která takovýto nosič obsahuje. Kompozice obsahuje alespoň jednu probiotickou kulturu adherovanou na nosič, přičemž probiotická kultura je alespoň v iniciačním stádiu tvorby biofilmu. Dále se vynález týká potravinářského, farmaceutického nebo veterinárního výrobku, který tuto kompozici obsahuje.

10 Mezi tyto výrobky patří doplňky stravy, produkty pro zvláštní výživu, potraviny, nápoje, léčiva, zdravotnické prostředky, kosmetické a hygienické produkty, veterinární krmiva a doplňky s obsahem probiotických kultur.

### 15 Dosavadní stav techniky

Díky pestré škále fenotypových projevů představují mikroorganismy nejúspěšnější formu existence života na Zemi. Mohou žít buď volně ve vodním prostředí, tzv. planktonické buňky (rovněž solitérní, jednotlivé), nebo ve společenství, které vytváří tenkou vrstvu na pevných

20 tělesech - biofilm. Tato forma je pro mikroorganismy z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí je i základním způsobem jejich přirozeného výskytu (kameny v rybníce, žumpy, průmyslové odpady, bioreaktory, zuby atd.). Vhodné podmínky pro tvorbu biofilmu jsou rovněž cizí tělesa v lidském těle (kanyly, katetry, implantáty), na druhou stranu přátelský biofilm střevní sliznice chrání před kolonizací patogenních mikroorganismů a napomáhá správné funkci GIT (Huang a kol., 2011, Schindler, 2001). Růst ve formě biofilmu poskytuje buňkám také větší ochranu (Huang a kol., 2011, Hoiby a kol., 2010).

Tloušťka (cca 1 až 1000 µm) biofilmu závisí na dostupnosti živin, kyslíku a na počtu rodů či druhů, které biofilm vytváří. V přirozeném prostředí je naprosto převažující vícedruhové

30 společenství mikroorganismů. Biofilm se skládá z agregátů a dutin, které jsou propojeny kanálky. Pomocí kanálků mohou pronikat jak živiny, tak metabolity či signální molekuly do hlubších vrstev biofilmové struktury. Přesto se například koncentrace kyslíku liší v závislosti na vzdálenosti od povrchu biofilmu: nižší vrstvy jsou zpravidla méně zásobeny kyslíkem a převládá v nich anaerobní prostředí. Vytváří se tak specifické oblasti biofilmu a biofilm nemá homogenní

35 strukturu. Bakterie jsou v rámci biofilmové struktury rozloženy nerovnoměrně a rostou v tzv. mikrokoloniích (Schindler, 2001). Podrobně popsány jsou „směsné“ biofilmy tvořené rody *Saccharomyces*, *Lactobacillus plantarum* a *Leuconoctoc mesenteroides* (Furukawa a kol., 2015).

Vznik biofilmu je podmíněn přítomností vhodného materiálu, na který se mikroorganismus může uchytit, dostatečným množstvím živin a jednotlivými solitérními buňkami. Přichycení buněk na povrch je komplexní proces, který je usnadněn, pokud je povrch hydrofobní (Donlan, 2002). Jakmile buňky pomocí speciálních látek, tzv. adhezínů (bílkoviny, polysacharidy, glykopeptidy), přilnou k povrchu, změni svůj fenotypový projev (bičíky, fimbrie, produkce proteinů, bílkoviny pórů buněčné stěny atd.) a začnou produkovat do prostředí velké množství polysacharidu s

45 lepivými vlastnostmi. Tyto látky, které tvoří zhruba 50 až 90 % mokré biomasy biofilmu, slouží jako jakási hlenová matrice (EPS, extracellular polymeric substances), drží buňky pohromadě a umožňují rozšiřování a zvětšení biofilmu. Regulace genové exprese nastává v řádu minut po přichycení jednotlivých buněk k povrchu (Donlan, 2002), výrazně se liší u planktonické a biofilmové formy (Watnick a Kolter, 2000). U přibližně 22 % genů dochází ke zvýšení exprese.

50 Jedná se o geny, jejichž produkty jsou potřebné pro rozvoj biofilmu (např. produkce exopolysacharidů), u 16 % genů dochází ke snížení exprese (Flemming a Wingender, 2010, Watnick a Kolter, 2000). Extracelulární matrix je dobře hydratovaná, je tvořena zejména polysacharidy, bílkovinami, nukleovými kyselinami a lipidy. Poskytuje mechanickou stabilitu biofilmu, zprostředkovává adhezi k povrchu a tvoří kohezni 3D strukturu, která drží buňky pohromadě a umožňuje komunikaci buněk a jejich imobilizaci v biofilmu. Zároveň chrání buňky

55

před extracelulárními enzymy. Extracelulární matrix se může mezi jednotlivými biofilmy významně lišit v rozpustnosti a ve svém složení, které odpovídá druhovému zastoupení, teplotě i dostupnosti živin, a její množství roste se stářím biofilmu. Extracelulární bakteriální struktury, fimbrie a bičíky, mohou mít význam při stabilizaci biofilmu.

5

Exopolysacharidy produkované kmenem *Lactobacillus plantarum* YW32 a jejich bioaktivita byly detailně charakterizovány. Byly složeny z manózy, fruktózy, galaktózy, glukózy v přibližném poměru 8,2 : 1 : 4,1 : 4,2. Mikrostrukturní studie potvrdila pavučinovou strukturu složenou z kompaktních vláken a přítomnost mnoha homogenních tyčinkovitých zduřelin. Exopolysacharidy

10 vykazovaly vysokou teplotní stabilitu (teplota degradace zhruba 283 °C) a odolnost vůči hydroxylovým a superoxid-radikálům při množství 5 mg/ml. Dále inhibovaly tvorbu biofilmu některých patogenních bakterií, např. *E. Coli* O157, *Shigella flexneri* CMCC(B), *Staphylococcus aureus* AC1, *Salmonella typhimurium* S50333, tato vlastnost ale byla závislá na koncentraci těchto exopolysacharidů. Dobrá inhibiční aktivita byla zaznamenána proti buňkám rakoviny

15 střeva HT-29. Tyto výsledky naznačují, že samotné exopolysacharidy by mohly být užívány jako doplňky stravy (Wang a kol., 2015).

V plně vytvořeném biofilmu spolu buňky komunikují díky tzv. quorum sensing a díky speciálním chemickým signálům (jednoduché látky či peptidy), které řídí dělení buněk, hustotu populace,

20 aktivaci či umlčení genové exprese, tvorbu hlenové matrice či tvorbu proteinů, které je štěpí (Schindler, 2001). Pokud populace dosáhne určité hustoty, tedy i tyto signály dosáhnou určité koncentrace, aktivují se geny, které ovlivňují diferenciaci biofilmu (Donlan, 2002).

Struktura biofilmu je heterogenní a neustále se mění v závislosti na vnějších i vnitřních procesech. Bylo dokázáno, že buňky z jednotlivých mikrokolonií migrují v rámci biofilmu. Struktura mikrokolonií se mění z kompaktní do volné a jednotlivé buňky mohou opouštět biofilm

25 (Donlan, 2002). Malá vzdálenost mezi mikrokoloniemi představuje ideální prostředí pro vytváření gradientu živin, výměnu genů a quorum sensing. 3D struktura biofilmu, a to zejména povrchové parametry ukazující heterogenitu biofilmu a objemové parametry, které popisují velikost a morfologii biomasy, byla detailně popsána v práci Beyenal a kol. (2004).

30

Hlavní mechanismy pro přežívání biofilmu a uvnitř biofilmu jsou: ochrana proti oxidativnímu stresu specifická pro biofilm, exprese efluxních pump a ochrana pomocí matrixových polysacharidů (de Angelis a kol., 2015).

35

#### Biofilm v lidském těle

Za normálních podmínek je v lidském organismu biofilm přítomen jako zubní plak, který lze odstranit, ale vždy se vytvoří znovu. Biofilm v ústech je zpravidla tvořen grampozitivními

40 bakteriemi (*Streptococcus*, *Staphylococcus*) a kvasinkami. Bylo identifikováno zhruba 700 druhů bakterií kolonizujících jazyk, zuby a dutinu ústní. Biofilm v ústech a jeho produkty přispívají ke zdravému stavu dásní a zubů (Huang a kol., 2011).

V nekrotických tkáních, ve žlučových cestách, při infekci kostní dřeně, zánětu prostaty či cystické fibróze se biofilm může rozvinout i ve tkáních a může být zdrojem ohniskové infekce. Je-li do těla (arterie, žíly, močové trubice) zavedena cévka, může se biofilm rozvinout na jejím

45 povrchu v rámci několika dní a představovat zdroj nákazy. Velkým problémem je osídlení umělých srdečních chlopní či děložního těliska. Největší „výhodou“ biofilmu je vyšší odolnost, nepropustnost pro látky a vyšší kontakt mezi buňkami, tedy i snadnější možnost výměny genů, zejména pro virulenci a rezistenci k antibiotickým látkám. Typickým příkladem jednodruhového biofilmu jsou infekce srdečních chlopní, kdy se tvoří fibrinový matrix, který chrání bakterie před leukocyty (Donlan, 2002).

50

Největší množství biofilmu obsahuje gastrointestinální trakt (GIT). Výzkum vývoje a funkce biofilmu v GIT je do značné míry omezen pouze na nemocné pacienty z důvodu odebrání vzorků

55

biopsií či materiálem z chirurgických zákroků. To je spojeno i s užíváním antibiotik či „vypláchnutím“ střeva před endoskopií nebo kolonoskopií (Macfarlane a Dillon, 2007). Získané vzorky tedy nemusí být reprezentativním příkladem kolonizovaného střeva.

- 5 Epiteliální buňky jsou přirozeně pokryty vrstvou slizu, který znemožňuje usednutí patogenních mikroorganismů. Mikroorganismy v tlustém střevě mohou existovat jako individuální buňky, v mikrokoloniích či ve shlucích s ostatními druhy (Macfarlane a Dillon, 2007). V ojedinělých případech může biofilm tvořit pouze jeden mikrobiální druh (infekce srdečních chlopní, katetrů, 10 prostetik). Biofilm v prostředí GIT je obvykle vícedruhový a jeho rozvoj je ovlivněn podmínkami prostředí, živinami a obrannými vlastnostmi imunitního systému jedince (Macfarlane a Dillon, 2007). Jednotlivé buňky se liší od biofilmových zejména v metabolické aktivitě, vyšší rezistenci k antibiotikům a ostatním nepříznivým vlivům jako např. nízké pH.

- Horní část GIT (žaludek, jícen) obsahuje převážně fakultativně anaerobně kultivovatelné 15 mikroorganismy, které se sem dostávají z dutiny ústní (streptokoky, laktobacily). V žaludku se běžně vyskytují bakterie rodu *Lactobacillus*, *Helicobacter pylori* a bakterie tolerantní k nízkému pH. Hodnota pH nižší než 4 výrazně eliminuje růst mikroorganismů. Biofilm v lumen střeva je tvořen živými i mrtvými buňkami, je účinnější při štěpení polysacharidů oproti neadherujícím buňkám a vytváří jako koncový produkt acetát oproti butyrátu u neadherujících (Macfarlane a 20 Dillon, 2007). Byly zaznamenány drobné rozdíly v enzymatické aktivitě zejména pro enzymy s proteolytickou či peptidolytickou aktivitou, která usnadňuje narušení mucinu na povrchu epiteliálních buněk. Mukózní biofilm je tvořen zejména eubakteriemi, bifidobakteriemi, klostridii a širokou škálou grampozitivních koků. Patrné je ale i odlišné druhové zastoupení u každého jedince s ohledem na stravu a zdravotní stav. Složení mukózního biofilmu je výrazně 25 odlišné od složení mikrobiomu ve stolici (Macfarlane a Dillon, 2007).

- Probiotické bakterie mohou inhibovat či pomoci předcházet infekcím močového ústrojí. Inhibice tvorby biofilmu *E. coli* NTC 9001 a *Enterococcus faecalis* NTC 00775 byla prokázána bez 30 ohledu, zda bylo použito jednodruhové či vícedruhové probiotikum (Chapman a kol., 2013, Chapman a kol., 2014).

#### Biofilm probiotických bakterií

- Biofilm chrání buňky před antibakteriálními látkami, fagy, imunitním systémem hostitelského 35 organismu, zvyšuje jejich rezistenci k nízkému pH, organickým kyselinám, k nedostatku živin, vysychání a umožňuje setrvání na jednom místě v proudícím tekutém prostředí. Extracelulární polysacharidy, které tvoří matrix biofilmu, ovlivňují adhezi bakterií na mukózu, což je předpokladem pro jejich pozitivní působení v makroorganismu. Biofilm by rovněž mohl být enkapsulován místo solitérních buněk a tak přispět ke zvýšení rezistence produkovaných 40 mikrokapslí dále přidávaných např. do funkčních potravin (Peržinová, 2014).

- Tvorba biofilmu u probiotických bakterií je považována za výhodnou vlastnost, neboť usnadňuje kolonizaci a dlouhodobé přetrvání v hostitelském organismu (Terraf a kol., 2012). Druhy i 45 jednotlivé kmeny se mezi sebou liší v probiotických vlastnostech, např. místně specifická adheze v GIT, vliv na imunitu hostitele i jeho zdravou, případně zanícenou sliznici (Soccol a kol., 2010). Všechny testované kmeny rodu *Lactobacillus* prokázaly schopnost vytvářet biofilm na polystyrénovém povrchu, přičemž *Lactobacillus acidophilus* vykazoval nejvyšší míru tvorby biofilmu. Byla prokázána ko-agregace mezi laktobacily a třemi patogenními kmeny (Ventolini, 2014). Ve studii Lin a kol. (2015) byla prokázána inhibice kmene *Streptococcus mutans* 50 testovanými probiotickými kmeny *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* LC01, *Lactobacillus plantarum* ST-III, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 a *Lactobacillus rhamnosus* HN001. Supernatant pouze dvou kmenů (Shirota, HN001) byl schopen inhibovat *S. mutans* rostoucí v biofilmu. Inhibice byla zapříčiněna tvorbou kyselého prostředí a bakteriocinům podobnými peptidy.

55

Byla provedena řada testů na antimikrobiální účinky různých probiotických kmenů včetně kmenů izolovaných z epitelů hostitelských organismů. Některé probiotické účinky jsou v biofilmu zesíleny, např. kmeny *L. reuteri* produkovaly v biofilmu více reuterinu - antimikrobiálního faktoru inhibujícího grampozitivní i gramnegativní bakterie, kvasinky i protozoa (Jones a Versalovic, 2009). Kmeny rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus* izolované z vaginální mikroflóry klisen byly charakterizovány (adheze k vaginálnímu epitelu, antimikrobiální aktivita, tvorba biofilmu) za účelem získání vhodných kmenů, které by mohly být využity jako probiotika koní (Fraga a kol., 2008). *Lactobacillus fermentum* SK5 izolovaný z vaginální mikroflóry zdravé ženy byl testován jako možné probiotikum. Tento kmen přežíval v pH 3 až 4 a 0,1 až 0,2% žluči, nebyl ovlivněn pepsinem (3 g/l) ani pankreatinem (1 g/l). Kmen *L. fermentum* SK5 má antimikrobní potenciál vůči gastrointestinálnímu patogenu *E. coli*, vaginálnímu patogenu *Gardnerella vaginalis*, zároveň u něho byla prokázána schopnost adheze k epiteliálním buňkám (HeLa, HT-29 a Caco-2) a tvorba biofilmu (Kaewnopparat et al., 2013). *Lactobacillus iners*, nejčastěji izolovaný mikroorganismus z vaginy zdravých žen, narušoval povrch, hustotu i hloubku biofilmu rodu *Gardnerella* (Saunders a kol., 2007). Klinické studie potvrdily, že kmeny *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 a *Lactobacillus reuteri* RC-14 snižovaly riziko bakteriálních vaginóz (Saunders a kol., 2007). Dále byly testovány (autoagregace, adheze k mucinu a tvorba biofilmu) kmeny druhů *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* izolované z vaginy (Tomáš a kol., 2005, Terraf a kol., 2014). U kmenů *Lactobacillus* izolovaných z vagin zdravých žen byla prokázána tvorba hydrogen peroxidu a při nejnižší koncentraci 280 pg/ml prokazatelně inhibovaly růst cervikálních i jiných patogenů, *Salmonella*, *Gardnerella*, *Chlamydia*, *Trichomonas*, *Neisseria* (Dasari a kol., 2014). V práci Pascuala a kol. (2010) bylo testováno 100 kmenů rodu *Lactobacillus* izolovaných z vagin zdravých žen. Kmen *L. fermentum* L23 byl vybrán (schopnost tvořit bakteriociny, schopnost kolonizace, autoagregace, adherence k vaginálnímu epitelu, agregace k bakteriálním patogenům) jako vhodný kandidát pro pokusy na myších, které potvrdily, že tento kmen by mohl být vhodnou alternativou při léčbě genitálních infekcí. Kmeny *Lactobacillus plantarum* LP01 a *Lactobacillus fermentum* LF15 by mohly přispívat k dlouhodobé ochraně díky jejich integraci do vaginálního mikrobiomu a adhezi k epiteliálním buňkám při použití vaginálních tablet, které pomalu uvolňují obsah. Oba kmeny byly schopny potlačit růst *Gardnerella vaginalis* a in vitro i *E. coli*, mohou tak potlačit nejen anaerobní patogeny (Vicariotto a kol., 2014).

Ve studii Tulumoglu a kol. (2013) bylo testováno 20 kmenů rodu *Lactobacillus* z dětské stolice (věk dětí 4 až 15 let) pro jejich schopnost přežít i za nízkého pH (2; 2,5 a 3), v přítomnosti žlučových solí (0,25; 0,5 a 0,75 % žlučových solí). U kmenů byl testován vliv na růst patogenů a citlivost vůči 13 vybraným antibiotikům. Všechny použité kmeny inhibovaly růst *E. coli* ATCC11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a byly rezistentní k teikoplaninu, vankomycinu a bacitracinu. Kmeny produkovaly 70 až 290 mg/l exopolysacharidů. Dosažené výsledky naznačují, že testy pro produkci exopolysacharidů, toleranci ke žlučovým solím, antimikrobiální aktivitu, antibiotickou rezistenci, agregaci laktobacilů mohou být využity při testování vhodných humánních probiotických kmenů (Tulumoglu a kol., 2013).

Studie Aoudia a kol. (2016) srovnávala tři kmeny rodu *Lactobacillus* izolované z lidské stolice nebo slin (*L. plantarum*, *L. fermentum*). Kmeny tvořily biofilm na abiotickém povrchu s rozdílným množstvím biomasy. Pomocí metody růstu v mikrotitrační destičce s napodobením prostředí GIT bylo zjištěno, že osmolarita a nízká koncentrace žluči výrazně ovlivnila prostorovou organizaci laktobacilů. Kmeny *L. plantarum* tvořily biofilm i za vysoké koncentrace žluči a hlenu. Dále bylo prokázáno, že supernatant laktobacilů produkoval v biofilmu molekuly, které inhibovaly patogeny vyskytující se v jídle. Supernatant buněk biofilmu, ne však supernatant volných buněk, potlačil produkci tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$ .

Probiotické bakterie či bakteriální biofilm by se mohl využívat při prevenci proti zubnímu kazu. Antimikrobiální aktivita proti ústním streptokokům byla sledována v práci Lee a Kim (2014). Probiotika byla přidána k bakteriím ve slinách, které obsahovaly i *Streptococcus mutans*. Kmeny

rodu *Lactobacillus* silně inhibovaly růst ústních streptokoků a tvorbu biofilmu, který přispívá k zubnímu kazu.

5 Supernatant kultury *Lactobacillus casei* ATCC334 jak planktonních buněk, tak biofilmu byl použit pro ošetření makrofágních monocytických buněk THP-1. Produkce tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  byla potlačena pouze v přítomnosti supernatantu biofilmové formy kultury (konkrétně GroEL) a bylo potvrzeno, že rozvoj biofilmu u rodu *Lactobacillus* ovlivňoval imunitní odpověď (Rieu a kol., 2014).

10 Rozdíl mezi biofilmovou a soliterní buňkou

Práce de Angelis a kol. (2015) porovnává soliterní a biofilmovou formu buněk *Lactobacillus plantarum* DB200. Buňky rostoucí v biofilmu byly delší a shlukovaly se ve větší míře než soliterní buňky. Poměr mezi spotřebovanou glukózou a syntézou laktátu významně poklesl v „biofilmových podmínkách“. Při srovnání proteomu byl rozdíl 115 bodů u exoproteomu (extracelulární bílkoviny a bílkoviny buněčné stěny) a 44 bodů u proteomu (cytoplazmatické bílkoviny) mezi oběma formami. Snížená či zvýšená regulace (nejméně 2x) byla zaznamenána u těchto funkčních kategorií: stavba buněčné stěny a katabolické procesy, buněčný cyklus a adheze, transport, glykolýza, metabolismus uhlovodíků, metabolismus exopolysacharidů, metabolismus aminokyselin a bílkovin, biosyntéza mastných kyselin a tuků, metabolismus nukleotidů a purinu, odpověď na stres, oxidačně/redukční procesy a energetický metabolismus. Biofilmová kultura vykazovala vysoký stupeň exprese stresových proteinů (např. DnaK, GroEL, ClpP, GroES, kataláza), který jí napomáhá k přežití nepříznivých podmínek v prostředí. U rodu *Lactobacillus* dochází ke zvýšené syntéze extracelulárních bílkovin a bílkovin (včetně molekulárních chaperonů, enzymů, lipoproteinů), umístěných na povrchu buňky, které jsou zodpovědné za adhezi při růstu ve formě biofilmu.

Rozdílná morfologie biofilmů *L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149, *L. brevis* JCM 1059 a *L. fructivorans* JCM 1117 na krycích skličkách byla prokázána (Kubota a kol., 2008). Povrch vytvořených biofilmů (hladký či drsný) i tvar buněk laktobacilů se lišil. Většina buněk *L. fructivorans* a některé buňky *L. brevis* byly v biofilmu delší než v suspenzi (soliterní buňky), v případě *L. plantarum* vykazovaly buňky stejnou morfologii. U kmene *L. rhamnosus* CRL 1332 a *L. reuteri* CRL 1324 nebyly zaznamenány žádné změny v morfologii buněk v biofilmu oproti planktonním buňkám (Terraf a kol., 2012). Změny morfologie u části buněk v biofilmu *L. plantarum* 8-RA-3 vytvořeném na otrubách byly popsány v práci Ushakova a kol. (2012).

Modelový systém pro interakci patogenního a probiotického biofilmu, který mění podmínky prostředí (místní zvýšení koncentrace kyseliny mléčné a snížení pH prostředí) byl vytvořen v práci Eberl a kol. (2010).

40 Probiotika, probiotické mikroorganismy

Lidský GIT je osídlen mikrobiálním společenstvem tvořeným stovkami různých druhů. Střevní mikroflóra hraje významnou roli nejenom při trávení potravy, metabolismu endogenních a exogenních látek a produkci esenciálních vitaminů, ale i při zvyšování imunitní odpovědi organismu a při prevenci infekcí způsobených patogenními bakteriemi (Gibson a Robefroid, 1995).

Dle definice jsou probiotika živé mikrobiální doplňky stravy, které prospěšně působí na hostitele zlepšováním rovnováhy mikroflóry ve střevě (Fuller, 1989). Aktuálnější definici pro výživu člověka navrhli Salminen a kol. (1998): probiotika jsou živé mikrobiální složky potravy, které jsou zdraví prospěšné. Podle FAO/WHO (2002) jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, jejichž podávání hostiteli v adekvátním množství vede ke zlepšení zdraví hostitele.

55

Kromě prokázaných terapeutických vlastností musí probiotické mikroorganismy splňovat další požadavky. Zvláštní důraz je kladen na bezpečnost (Fric, 2007). Jedná se minimálně o tyto vlastnosti: nepatogenní vlastnosti (včetně produkce toxinů), rezistence k žaludečním kyselinám a žluči, adheze na buňky střevního epitelu, schopnost kolonizovat střevo, prokázaný příznivý vliv na hostitele, bezpečnost. Kmeny musí být jednoznačně identifikované a zároveň uložené v mezinárodní sbírce mikroorganismů.

#### Bakterie mléčného kvašení

- Bakterie mléčného kvašení jsou významné probiotické mikroorganismy, které působí především v GIT člověka. Zástupci jsou klasifikováni pomocí fenotypových vlastností, morfologie, způsobu fermentace glukózy, růstu při různých teplotách, konfigurace kyseliny mléčné a fermentace sacharidů (Holzapfel a kol., 2001). Mezi probiotické bakterie mléčného kvašení patří rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* (Holzapfel a kol., 2001).

- Do skupiny bakterií mléčného kvašení podle novější nomenklatury nepatří rod *Bifidobacterium*, náleží do zcela jiné větve (*Actinobacteria*) než ostatní mléčné bakterie. Vzhledem k podobným fyziologickým vlastnostem, způsobu využití v potravinářském průmyslu a také s ohledem na společnou historii bývá do této skupiny přiřazován (Borriello a kol., 2003).

#### Kultivace probiotických bakterií

- Životaschopnost probiotických mikroorganismů závisí na mnoha faktorech, např. kmeni mikroorganismu, složení kultivačního média, uchovávání. Pro kultivaci skupiny probiotických laktobacilů se využívá specifické médium, které obsahuje zdroje uhlíku (nejčastěji cukry s krátkým řetězcem - maltóza, sacharóza, glukóza, fruktóza), růstové faktory (zdroje dusíku, peptidy a aminokyseliny, minerály, vitamíny) a má pufrovací kapacitu. Uchování probiotických preparátů závisí na jeho formě - tekutá nebo sušená forma. Příprava tekuté formy probiotik je snazší a může být využita ihned, nevýhodou je kratší životnost preparátů. Sušené kultury (mrazem či sprejově) vyžadují víceukrokový postup, ale životnost preparátu je delší (Puphan a kol., 2013).

- Kultivace probiotických laktobacilů probíhá v tekutých bujónech s provzdušňováním či třepáním (Puphan a kol., 2013, Ushalcova a kol., 2012). Nejčastěji se využívá MRS médium, případně jiné médium složené např. z kvasničného extraktu, vitamínů, Tweenu 80, tryptonu, glukózy či jiných zdrojů cukrů (Ling, 2004). Složení média je závislé na použitém kmeni a typu kultivace. Důležitá je při kultivaci rovněž optimalizace pH, aerace, třepání, inokulační dávky a teploty pro daný mikrobiální kmen. Dobrých výsledků pro produkci biomasy u kmene *L. rhamnosus* ATCC 7469 bylo dosaženo při kontinuální kultivaci oproti vsádkové (statické) kultivaci (Ling, 2004).

- Výše zmíněné kultivace probíhají v tekutých médiích za provzdušňování či míchání v baňkách nebo fermentorech, získané buňky jsou tedy ve vznosu v solitérní, nikoli v biofilmové formě.

- Tvorba biofilmu je převážně studována na abiotických površích, které mohou být potaženy biologickými molekulami. Nejčastěji se využívá statická kultivace v polystyrénové mikrotitrační destičce, průtoková kyveta či kultivace v Petriho misce (Peržinová, 2014). Vznik i množství biofilmu je závislé na kultivačních podmínkách i kmeni mikroorganismu. Například tvorba biofilmu u kmene *L. fermentum* izolovaného ze zubního plaku ve skleněné průtokové kyvetě potažené mucinem MUC5B z lidských slin byla prokázána (Wickstrom a kol., 2013).

- Metody pro kultivaci biofilmu v laboratorních podmínkách závisí na vybraném mikrobiálním kmeni či společenstvu kmenů (McBain, 2009). Uzavřené systémy používané pro kultivaci jsou: agary, mikrotitrační destičky; otevřené systémy: suspendovaný substrátový chemostat (jakýkoli

substrát, na který se buňky mohou uchytit, přidáný do reaktoru, např. skleněné kuličky, smaltovaná či emailová hmota, biomateriály, skleněná vlna, hydroxyapatitový substrát). Suspendovaný substrátový chemostat má výhodu i v tom, že volné buňky mohou vytvářet biofilm na rozhraní pevné látky a tekutiny. Využití suspendovaného substrátového chemostatu je zejména při studiu zubního, ústního a střevního biofilmu a genové exprese v biofilmu. Tento systém je dostupný i komerčně. Dalším typem jsou průtokové kyvety (možnost mikroskopického monitorování a odnímání částí biofilmu), Robbinsův přístroj, tj. plastová či železná tyč, do které se vsunuje kolíček, CDFF (constant depth film fermenter), DFBR (drip flow biofilm reactor), promývací biofilmový reaktor, promývací membránový reaktor, Sorbarod biofilm reaktor.

Ke kultivaci biofilmu je možné využít řady metod (statická, dynamická i kontinuální kultivace) s tím, že většina metod je využitelná pouze pro laboratorní měřítko. Největším problémem je nedostatek standardizace, obtížné nastavení přesně definovaných podmínek a omezené využití při řešení specifických výzkumných cílů (Peržinová, 2014). Při kontinuální kultivaci probiotik může snáze docházet ke kontaminaci a buňky mohou časem ztrácet své vlastnosti (Lacroix a Yildirim, 2007).

Pro kultivaci bifidobakterií je nutno dodat komplexní hydrogenní substrát (hovězí kasein, syrovátka, kvasničný extrakt). Růst v odstředěném mléce je nízký a kmenově specifický (Doleyes a Lacroix, 2005). Další možností je kultivace mléčných bakterií a bifidobakterií v imobilizovaném systému - uchycení v polymerní síti, přichycení či adsorpce k nosiči, uchycení k membráně či mikroenkapsulace, což je výhodnější z hlediska zisku biomasy a tvorby metabolitů (hustota buněk, opakované využití biokatalyzátorů, odolnost ke kontaminaci a bakteriofágům, předcházení vymývání při kontinuální kultivaci, fyzikální a chemická ochrana buněk). Dva typy imobilizačních metod byly testovány pro propagaci bifidobakterií: membránové bioreaktory a kuličky z polysacharidového gelu.

U membránových systémů s kontinuálním průtokem jsou buňky udržovány v systému díky ultrafiltrům či mikrofiltrům (membrány) zatímco malé molekuly přes filtry procházejí. Produkce buněk bifidobakterií je v některých případech až 15x vyšší než při klasické kultivaci v tekutém médiu. Nevýhodou metody je, že buňky nejsou vhodné pro opakované použití z důvodu nízké viability a snížené metabolické aktivity, vysoké pořizovací ceny, údržby a zanášení membrán (Doleyes a Lacroix, 2005, Lacroix a Yildirim, 2007).

Sférické polymerní kuličky (0,3 až 3 mm) se vyrábí lisovací nebo emulzní tepelnou technikou (např. agaróza, želatina) či ionotropní (alginát, chitosan) želatinací kapek. Inkubace imobilizovaných buněk v živném médiu vytváří oblasti s vysokou koncentrací buněk, které se šíří z kuličky. Růst mimo kuličku je limitován nedostatkem substrátu, akumulací inhibičních produktů a nízkým pH. Pokud buňky v kuličce rostou ve formě biofilmu, velké množství buněk se uvolňuje ze svrchní vrstvy do fermentačního média jako následek expanze buněk, kolizí mezi sebou a střížných sil v reaktoru. Limitujícím faktorem imobilizovaných mléčných bakterií a bifidobakterií je inhibice metabolity a hodnotami pH (Doleyes a Lacroix, 2005, Lacroix a Yildirim, 2007). Tento typ kultivace umožňuje výrobu směsné kultury v případně nezávislé imobilizace více druhů, např. *Bifidobacterium longum* a *Lactococcus lactis*, v závislosti na teplotě a době kultivace (Doleyes a Lacroix, 2005).

#### Podstata vynálezu

Nedostatky řešení dosavadního stavu techniky zvláště v oblasti zlepšení adheze probiotik ke sliznici řeší probiotická kompozice, která obsahuje alespoň jednu probiotickou kulturu, která je alespoň částečně ve formě biofilmu na nosiči. Výrazně lepší adhezi kompozice zajišťuje především díky přítomnosti fixační složky, kterou je hydroxypropylmethylcelulóza. Ta je součástí nosiče určeného ke kultivaci probiotických kultur. Podstatou nosiče podle vynálezu je, že obsahuje koloidní SiO<sub>2</sub>, prebiotickou složku a hydroxypropylmethylcelulózu (dále HPMC).



Podle dalšího provedení nosiče podle vynálezu je množství koloidního SiO<sub>2</sub> 0,001 až 50 % hmotn., s výhodou 0,1 až 5 % hmotn., množství probiotické složky je 0,01 až 99 % hmotn. s výhodou 10 až 60 % hmotn. a množství hydroxypropylmethylcelulózy je 0,1 až 95 % hmotn. s výhodou 5 až 60 % hmotn. Povrch koloidního SiO<sub>2</sub> dosahuje hodnoty v rozsahu 2 m<sup>2</sup>/g až 200 m<sup>2</sup>/g. Prebiotická složka obsažená v nosiči podle vynálezu je vybrána ze skupiny zahrnující inulin, dextrin, maltodextrin, kukuřičný škrob, bramborový škrob, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, ovocné extrakty, zeleninové extrakty, obilné extrakty, luštěninové extrakty, lyofilizované ovoce, s výhodou banán; lyofilizovanou zeleninu, s výhodou mrkev nebo dýně; nebo jejich směsi.

Probiotická kompozice podle vynálezu obsahuje alespoň jednu probiotickou kulturu kultivovanou s nosičem v množství 1.10<sup>3</sup> až 1.10<sup>14</sup> CFU na 1 g finální kompozice, ve výhodném množství 1x10<sup>9</sup> CFU/g a nosič podle vynálezu v množství alespoň 0,001 % hmotn., přičemž probiotická kultura je alespoň částečně ve formě biofilmu přilnutého k nosiči. Obsah nosiče v kompozici podle vynálezu je s výhodou 0,01 až 10 % hmotn.

S výhodou alespoň 0,1 až 100 % hmotn. probiotické kultury přilnuté k nosiči (ve formě biofilmu), s výhodou 10 až 60 % hmotn. Probiotická kultura by neměla být kontaminována.

Podle dalšího provedení vynálezu jsou kmeny probiotické kultury vybrány ze skupiny zahrnující rod *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus* nebo jejich směsi.

Podle ještě dalšího provedení vynálezu kompozice dále obsahuje vitamíny, minerály, rostlinné extrakty, standardně kultivovanou probiotickou kulturu nebo směsi kultur, a jiné fyziologicky prospěšné substance či látky s prebiotickým potenciálem v maximálním množství do 99 % hmotn.

Standardně kultivované probiotické kultury nebo směsi kultur jsou takové kultury, které nejsou kultivovány na nosiči podle vynálezu. Množství standardně kultivované probiotické kultury nebo směsi kultur je alespoň 1.10<sup>4</sup> CFU na 1 g finální kompozice.

Podle dalšího provedení, je kompozice ve formě tablety, tobolky, pulvisu, gelu, roztoku nebo granulátu.

Potravinářský, kosmetický, hygienický, farmaceutický nebo veterinární výrobek obsahující kompozici podle vynálezu.

Pro účely tohoto vynálezu jsou v textu používány výrazy, které jsou definovány níže:

Biofilm je struktura skládající se z jednovrstevného nebo mnohvrstevnatého seskupení bakteriálních buněk jednoho nebo více bakteriálních druhů, které jsou usazeny v amorfním extracelulárním materiálu složeném zejména z exopolysacharidu nebo exopolysacharidů (EPS) bakteriálního původu, který pevně přilepuje buňky k povrchu nosiče a k sobě navzájem. Hmotn. % jsou vztažena k celkové hmotnosti nosiče nebo kompozice.

Bakterie usazené v biofilmu se vyznačují vyšší odolností vůči negativním vlivům vnějšího prostředí než bakterie v suspenzi, což má v praxi vliv na stabilitu produktu a jeho biologický účinek, což je dáno tím, že bakterie v živých systémech standardně tvoří biofilmovou strukturu. Také morfologie, fyziologie a metabolické produkty biofilmu jsou odlišné a specifické oproti planktonním formám téže kultury.

Nosičem se zde míní směs koloidního SiO<sub>2</sub> s prebiotickou látkou nebo jejich směsí a hydroxypropylmethylcelulózou.

Koloidní  $\text{SiO}_2$  má vysoký povrch dosahující hodnoty až  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  a vysokou afinitu k hydrofilním molekulám, díky čemuž slouží jako vysoce adhezivní podklad pro kultivaci bakterií adherujících ve vysoké míře na částici. Prebiotická složka podporuje růst a životaschopnost kultury a HPMC má funkci fixačního agens.

Nejdříve se kultivační médium s nosičem a inokulačním roztokem obsahujícím probiotickou kulturu kultivuje při teplotě  $20$  až  $40^\circ\text{C}$  do doby, kdy je alespoň  $0,5\%$  hmotn. nosiče pokryto probiotickou kulturou, poté se směs zkoncentruje a vysuší. Ve výhodném provedení se nejprve kultivační médium sterilizuje společně s nosičem, pak se do média přidá inokulační roztok obsahující probiotickou kulturu, následně se směs kultivuje při teplotě  $30$  až  $40^\circ\text{C}$  po dobu  $8$  až  $48$  hodin, a nakonec se směs zkoncentruje a vysuší.

Kultivační médium, které je možné použít, může být vybráno ze skupiny zahrnující sterilní mléko nebo syrovátku nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu nebo peptonu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton. Kultivaci probiotické kultury lze provádět v jednom kultivačním médiu nebo ve směsi kultivačních médií nebo s výhodou postupně ve dvou nebo více různých kultivačních médiích nebo jejich směsích. Kultivace může probíhat staticky nebo s mícháním nebo kombinovaně, tj. po určitou dobu staticky a po určitou dobu s mícháním.

Zkoncentrování může proběhnout například formou odstředění nebo ultrafiltrace a sušení může proběhnout například formou sušení na fluidní sušárně nebo lyofilizací.

S výhodou se zkoncentrovaná kompozice suší společně s přídavkem protektivní látky vybrané ze skupiny zahrnující maltodextrin, inulin, rozpustnou i nerozpustnou vlákninu, škrob, fruktooligosacharidy, karagenan, galaktooligosacharidy, glukooligosacharidy, manitol, trehalózu nebo jejich směsi, což usnadní sušení, zvýší výtěžek a usnadní následnou práci s materiálem.

Po sušení může následovat lisování kompozice do tablet, plnění do tobolek nebo plnění kompozice ve formě pulvisu či granulátu do sáčků či nádob nebo nápojů.

Kompozice podle vynálezu najde uplatnění například jako humánní i veterinární doplněk stravy, zvláštní výživa, potravina, nápoj, léčivo, zdravotnický prostředek, kosmetický a hygienický produkt, veterinární krmivo a doplněk s obsahem probiotických kultur.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Příklad 1

Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* je pomnožena na pevném MRS médiu při  $37^\circ\text{C}$  po dobu  $24$  hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do  $300 \text{ ml}$  Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými  $100 \text{ ml}$  MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při  $37^\circ\text{C}$  po dobu  $16$  až  $24$  hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky s povrchem minimálně  $10 \text{ m}^2/\text{g}$  ( $3\%$  hmotn.), HPMC ( $47\%$  hmotn.) a mrkvovým extraktem = prebiotickou složkou ( $50\%$  hmotn.). Kultivace probíhá při  $37^\circ\text{C}$  po dobu  $24$  hodin při otáčkách  $90 \text{ rpm}$ . Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně  $5$

% hmotn. nosiče bakteriemi alespoň z 5 % povrchu nosiče, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje s přídavkem 40 % hmotn. maltodextrinu. Případně se obdobně nakultivuje kmen *Bifidobacterium longum* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí.

## Příklad 2

### Fáze přípravy nosiče

0,3 g koloidní siliky s povrchem min. 2 m<sup>2</sup>/g se důkladně promíchá s 30 g jemně namleté lyofilizované mrkve a 10 g HPMC. Směs se zvlhčí 25 ml vody. Vzniklá kašovitá substance se důkladně promíchá a suší při 85 °C do zbytkové vlhkosti 2 až 7 %. Následuje přesítování přes 0,1 až 0,5 mm síto. Vzniklý komplex se suší a sterilizuje v horkovzdušné sušárně při teplotě 150 °C po dobu 6 hodin.

### Fáze kultivace

Probiotická kultura *Streptococcus salivarius* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.), mrkvový extrakt a HPMC. Následuje statická kultivace bez míchání při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 7 % hmotn. nosiče bakteriemi alespoň ze 3 % povrchu nosiče, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Případně se obdobně nakultivuje kmen *Bifidobacterium longum* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí.

## Příklad 3

### Fáze přípravy nosiče

3 g koloidní fumózní siliky se důkladně promíchá s 30 g jemně namleté lyofilizované nebo sušené mouky z banánu, která má funkci prebiotika a 80 g HPMC. Směs se zvlhčí 65 ml vody. Vzniklá kašovitá substance se důkladně promíchá a suší při 85 °C do zbytkové vlhkosti 2 až 8 %. Následuje přesítování přes 0,5 mm síto. Vzniklý komplex lze sterilizovat v horkovzdušné sušárně při teplotě 150 °C po dobu 5 hodin.

### Fáze kultivace

Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do čtyřlitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose

Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.) s mrkvovým extraktem. Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je

5 pokryto minimálně 0,5 % hmotn. nosiče bakteriemi alespoň z 0,1 % povrchu nosiče, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Případně se obdobně nakultivuje kmen *Bifidobacterium longum* a *Streptococcus thermophilus* (s ohledem na druh je nutné zvolení vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí.

#### Příklad 4

##### Fáze přípravy nosiče

15 0,4 g koloidní siliky se důkladně promíchá s 80 g jemně namleté lyofilizované mrkve, 2 g čekankového inulinu a 40 g HPMC. Směs se zvlhčí 80 ml vody a následně přidají se 2 g alginátového gelu. Vzniklá kašovitá substance se důkladně promíchá v mlýnku a suší při 85 °C do zbytkové vlhkosti 2 až 4 %. Následuje přesítování přes 0,5 mm síto. Vzniklý komplex lze sterilizovat v horkovzdušné sušárně při teplotě 150 °C po dobu 6 hodin.

##### Fáze kultivace

Probiotická kultura *Bifidobacterium bifidum* je anaerobně pomnožena na pevném MRS médiu s cysteinem při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou

25 kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média s cysteinem. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium,

30 Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.) s mrkvovým extraktem utvářející kompaktní částice za použití alginátového gelu. Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37

35 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 30 % hmotn. nosiče bakteriemi alespoň z 10 % povrchu nosiče, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Obdobně je nakultivován kmen *Bifidobacterium infantis* a *Streptococcus thermophilus* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané

40 lyofilizáty se homogenně smísí a použijí k výrobě pulvisu, kdy 50 % hmotn. tvoří maltodextrin, 40 % hmotn. inulin a 10 % hmotn. směs probiotických kultur v poměru 1:1:1.

#### Příklad 5

##### Fáze přípravy nosiče

0,3 g koloidní siliky se důkladně promíchá s 10 g bramborového rezistentního škrobu (nestravitelný škrob) a 1,5 g HPMC. Směs se zvlhčí 4 až 8 ml vody. Vzniklá kašovitá substance se důkladně promíchá a lyofilizuje do zbytkové vlhkosti 2 až 3 %. Následuje rozemletí na malé

50 částice na tříštivém mlýnku. Vzniklý nosič je následně sterilizován v horkovzdušné sušárně při 180 °C po dobu 120 min.

##### Fáze kultivace

- Probiotická kultura *Streptococcus salivarius* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin.
- 5 Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka, sterilní odtučené mléko, nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a
- 10 jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (4,5 % hmotn.), rezistentního bramborového škrobu a HPMC (hydroxypropylmethylcelulózy) (9 % hmotn.). Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37 °C po dobu 36 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 1 % nosičů bakteriemi, lze kultivaci ukončit.
- 15 Optimálně je pokryto min 10 % hmotn. nosiče alespoň z 5 % povrchu nosiče. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Obdobně je nakultivován kmen *Bifidobacterium longum* a *Lactobacillus rhamnosus* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí.

## 20 Příklad 6

### Fáze přípravy nosiče

- 0,2 g koloidní siliky se důkladně promíchá s 3 g jemně namleté sušené banánové mouky a 0,5 g
- 25 HPMC. Směs se zvlhčí 4 ml vody. Vzniklá kašovitá substance se důkladně promíchá a suší v horkovzdušné sušárně při 85 °C do zbytkové vlhkosti 2 až 4 %. Následuje přesíťování přes 0,5 mm síto.

### Fáze kultivace

- 30 Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin.
- 35 Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem
- 40 vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.), HPMC (30 % hmotn.) a sušenou banánovou moukou (67 % hmotn.). Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 10 % nosičů bakteriemi, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na
- 45 ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Obdobně je nakultivován kmen *Bifidobacterium longum* a *Streptococcus thermophilus* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí ideálně v poměru 1:1.

### Fáze výroby finálního produktu:

- 50 Sušená probiotická kultura *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus acidophilus*, každá kultura s koncentrací min.  $1 \times 10^8$  CFU/g, jsou smíchány v poměrech 5 % hmotn., kdy tvoří 20 % základu kasploviny. Nosič v každé probiotické kultuře tvoří po zakoncentrování minimálně 0,1 % hmotn. Následně je do směsi přidáno 7 %
- 55 hmotn. krystalické celulózy, 1 % hmotn. stearanu hořečnatého, 1 % hmotn. talku, 1 % hmotn.

kyseliny askorbové a 40 % hmotn. granulovaného čekankového inulinu a 30 % hmotn. kukuřičného škrobu - maltodextrinu Takto připravená směs je plněna do tvrdých želatinových tobolek.

## 5 Příklad 7

Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je předem vysterilizováno s kombinovaným nosičem, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.) s mrkvovým extraktem. Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 15 % hmotn. nosiče bakteriemi alespoň ze 3 % povrchu nosiče, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Obdobně je nakultivován kmen *Bifidobacterium longum* a *Streptococcus thermophilus* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média). Po ukončení kultivací jsou získané kultury těchto kmenů smíchány s cílem získání kvalitně promísené směsi kmenů, odstředěny na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizovány.

Fáze výroby finálního produktu:

Sušená probiotická kultura *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus acidophilus*, každá kultura s koncentrací min.  $1 \times 10^7$  CFU/g, jsou smíchány v poměrech 5 % hmotn., kdy tvoří 15 % základu tabletoviny. Tento základ obsahuje minimálně 0,1 % hmotn. nosiče. Následně je do směsi přidáno 6 % hmotn. krystalické celulózy, 1,5 % hmotn. stearanu hořečnatého, 1 % hmotn. talku, 1,5 % hmotn. kyseliny askorbové a 40 % hmotn. granulovaného čekankového inulinu a 35 % hmotn. sorbitolu. Takto připravená směs je použita k výrobě tablet.

## 35 Příklad 8

Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* je pomnožena na pevném MRS médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je odebrána mikrobiologickou kličkou jedna nebo více kolonií a přenesena do 300 ml Erlenmayerovy baňky s předem vysterilizovanými 100 ml MRS média. Kultivace probíhá stacionárně nebo za mírného třepání při 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Následuje převedení obsahu Erlenmayerovy baňky do dvoulitrového fermentoru s předem vysterilizovanými dvěma litry kultivačního média, jako je sterilní mléko nebo syrovátka nebo syntetická komerčně vyráběná média s obsahem kaseinu nebo kaseinhydrolyzátu, jako je např. Man-Rogosa-Sharpe medium, AOAC medium, Trypticase Soy Broth medium, Bacto Proteose Pepton medium, Reinforced Clostridial Broth, Trypton, Pepton a jiná. Médium je po sterilizaci doplněno o sušený kombinovaný nosič, kterým je základní nosič na bázi siliky (3 % hmotn.), standardního média dle kultury a agaru. Tento nosič je připravován jako standardní agarové médium s příměsí 3 % hmotn. nosiče, následně vysušen, pomlet na drobné komplexní částice a sterilizován zářením. Takto připravený kombinovaný nosič je stabilní a po rehydrataci připraven k přidání do média (rehydratace může proběhnout samovolně již v médiu). Následuje kultivace za současného míchání při 90 rpm při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průběžně se kontroluje tvorba bakteriálního pokrytí nosičů. V čase, kdy je pokryto minimálně 5 % nosičů bakteriemi, lze kultivaci ukončit. Po ukončení kultivace se kultura odstředí na průtočné odstředivce nebo na ultrafiltračním zařízení a lyofilizuje. Obdobně je nakultivován kmen *Bifidobacterium longum* a

*Streptococcus thermophilus* (s ohledem na druh vhodného kultivačního média) a získané lyofilizáty se homogenně smísí.

#### Příklad 9

#### Příprava nosiče

Nosič určený ke kultivaci probiotických kultur se připraví smícháním adhezivní složky, tj. koloidní  $\text{SiO}_2$  v množství 0,01 % hmotn. s prebiotickou složkou - dýňovou moukou v množství 80 % hmotn., a fixační složkou hydroxypropylmethylcelulózou v množství 19,99 % hmotn. s výhodou 5 až 60 % hmotn. Směs se tabletuje. Vyrobené tablety se rozemelou. Vzniklý prášek představuje nosič, který lze sterilizovat přímo v kultivačním médiu.

### PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nosič určený ke kultivaci probiotických kultur, **vyznačující se tím**, že obsahuje koloidní  $\text{SiO}_2$ , prebiotickou složku a hydroxypropylmethylcelulózu, přičemž množství koloidního  $\text{SiO}_2$  je 0,1 až 5 % hmotn., množství prebiotické složky je 10 až 60 % hmotn. a množství hydroxypropylmethylcelulózy je 5 až 60 % hmotn.

2. Nosič podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že povrch koloidní  $\text{SiO}_2$  dosahuje hodnoty v rozsahu  $2 \text{ m}^2/\text{g}$  až  $200 \text{ m}^2/\text{g}$ .

3. Nosič podle nároku 1 nebo nároku 2, **vyznačující se tím**, že prebiotická složka je vybrána ze skupiny zahrnující inulin, dextrin, maltodextrin, kukuřičný škrob, bramborový škrob, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, ovocné extrakty, zeleninové extrakty, obilné extrakty, luštěninové extrakty, lyofilizované ovoce, s výhodou banán; lyofilizovanou zeleninu, s výhodou mrkev nebo dýň; nebo jejich směsí.

4. Probiotická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jednu probiotickou kulturu kultivovanou s nosičem v množství  $1.10^3$  až  $1.10^{14}$  CFU na 1 g kompozice a nosič podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 v množství alespoň 3 % hmotn., přičemž probiotická kultura je alespoň částečně ve formě biofilmu přilnutého k nosiči.

5. Kompozice podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že alespoň 0,1 až 100 % hmotn. probiotické kultury je přilnuté k nosiči, s výhodou 10 až 60 % hmotn.

6. Kompozice podle nároku 4 nebo nároku 5, **vyznačující se tím**, že kmeny probiotické kultury jsou vybrány ze skupiny zahrnující rod *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus* nebo jejich směsí.

7. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 4 až 6, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje vitamíny, minerály, rostlinné extrakty, standardně kultivovanou probiotickou kulturu nebo směsí kultur, a jiné fyziologicky prospěšné substance.

8. Kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že množství standardně kultivované probiotické kultury nebo směsí kultur je alespoň  $1.10^4$  CFU na 1 g kompozice.

9. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 4 až 8, **vyznačující se tím**, že je ve formě tablety, tobolky, pulvisu, gelu, roztoku nebo granulátu.

10. Potravinářský, kosmetický, hygienický, farmaceutický nebo veterinární výrobek obsahující kompozici uvedenou v kterémkoli z nároků 4 až 9.