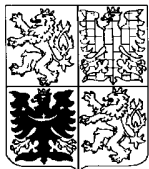


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.04.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.04.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19819475**
(33) Země priority: **DE**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/EP99/02925**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/57242**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4011

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 1/04

A 23 K 3/03

A 23 L 1/03

A 23 K 1/00

//(C 12 N 1/04, C 12 R 1:25)

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Runge Frank, Maxdorf, DE;

Cooper Bryan, Mannheim, DE;

Bröckel Ulrich, Freinsheim, DE;

Heinz Robert, Ludwigshafen, DE;

Harz Hans-Peter, Dudenhofen, DE;

Eidelsburger Ulrich, Hessheim, DE;

Käsler Bruno, Ludwigshafen, DE;

Keller Thomas, Lautersheim, DE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Sušené kultury mikroorganismu a způsob jejich
přípravy**

(57) Anotace:

Jsou popisovány suché kultury mikroorganismů obsahující alespoň jeden druh mikroorganismů ve formě vázané na nosič, kde kultura je přítomna ve formě částic, které a) mají velikost částice alespoň okolo 0,1 mm a b) jsou slisovány. Dále se uvádí způsoby přípravy suchých kultur mikroorganismů a jejich použití pro přípravu potravin a krmiv.

CZ 2000 - 4011 A3

10.01.01

-1. *zpráva*
Suché kultury mikroorganismů a *(jejich příprava)* PV 2070-4011

2900

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových suchých kultur mikroorganismů, které mohou být použity obzvláště k přípravě potravin a krmiv, a způsobů přípravy suchých kultur mikroorganismů.

Dosavadní stav techniky

Hlavní oblastí použití mikroorganismů, jako jsou bakterie a kvasinky, je příprava potravin a krmiv. Například tedy bakterie produkující kyselinu mléčnou, jako jsou bakterie rodu *Streptococcus* sp. nebo *Lactobacillus* sp., se použijí při přípravě mléčných výrobků, jako jsou kyselá smetana, podmásli, jogurt, kefír, kumis, tvaroh, a při přípravě kvásku a při konzervaci nevařených salámů, jako jsou pikantní salámy. Bakterie produkující kyselinu mléčnou se také používají při výrobě krmiv, jako je siláž.

Přípravky mikroorganismů požadované při přípravě potravin a krmiv se obvykle používají ve formě zákvasných kultur. Těmi obvykle nejsou čerstvě připravené kapalně kultury, ale buď kultury obvykle zmrazené v kapalném dusíku nebo suché přípravky. Suché přípravky jsou obvykle výhodné, jelikož jejich přeprava a skladování jsou technicky méně složité ve srovnání s mraženými přípravky.

Dosavadní stav techniky zahrnuje velmi rozličné typy suchých přípravků kultur mikroorganismů. Například tedy EP-A-0 131 114 popisuje přípravek obsahující *Lactobacillus*, kde se suspenze bakteriálních buněk nanese na práškovitý nebo

granulovaný nosičový přípravek a vysuší. Ke skladování přípravku je však nezbytné zabalit jej v ochranné plynné atmosféře neobsahující kyslík. DD 840 493 952 navrhuje lyofilizaci kmenů kultivovaných mikroorganismů k výrobě zákvasných kultur, jejich balení do filmu a jejich skladování při teplotě 279 až 288 Kelvinů. J-A-06/217713 popisuje výrobu zvláštních zákvasných kultur *Lactobacillu* sušením rozprašováním. EP-A-0 202 409 navrhuje vystavení suchých kultur vlhké granulaci, zpracování granulí k vytvoření kulovitých částic a jejich následné sušení. Navíc v četných publikacích existují návrhy k poskytnutí potahovaných suchých bakteriálních přípravků (viz např. US-A-3 677 897). V dosavadním stavu techniky jsou popsány četné různé způsoby k výrobě suchých přípravků mikroorganismů. Vedle způsobů lyofilizace a sušení pomocí lóže ve vzhledu zmíněných výše, je dalším alternativním způsobem výroby sušení suspenze mikroorganismů rozprašováním. Například tedy Stadhouders J. a kol., v *Neth. Milk Dairy J.*, 23, 182 (1969) popisuje sušení bakterií produkujících kyselinu mléčnou při teplotě 70 °C, spojené s krokem dosušování při teplotě 27 °C ve vakuu. K sušení není zjevně použit předem upravený, tj. předem vysušený, vzduch. Před sušením se k materiálu, který má být rozprašován přidá suspenze hydroxidu vápenatého. Mléčnan vápenatý, který se vytvoří během sušení rozprašováním je výhodný, jelikož údajně má nižší hygroskopicitu. V jiných způsobech sušení rozprašováním známých z dosavadního stavu techniky se rozprašují bakteriální suspenze, k nimž byly předem přidány nejrozličnější typy nosičových materiálů. Například tedy podle SU 724 113 se rozprašuje bakteriální suspenze smíšená se sušeným mléčným práškem, melasou a glutamatem sodným. Podle SU 1 616 990 se suší rozprašováním bakteriální suspenze smíšená s minerálem palygorskitem. WO-A-88/06181 popisuje sušení rozprašováním bakteriální suspenze smíšené s jilem.

JP-A-69/67989 popisuje sušení rozprašováním kvasinkových buněk nebo bakteriálních buněk, které jsou suspendovány v neutrálním nebo mírně kyselém roztoku, který obsahuje proteiny, karboxymethylcelulózu, alginat nebo ester alginatu, disacharidy nebo vyšší sacharidy nebo vícemocné alkoholy.

Suché přípravky mikroorganismů, které jsou dosud známy v dosavadním stavu techniky, obzvláště ty přípravky, které se používají k výrobě potravin nebo krmiv, mají alespoň jednu z následujících nevýhod:

- 1) obsah životaschopných mikrobů na jednotku hmotnosti suchého materiálu je velmi nízký vinou způsobu výroby, takže při konečné aplikaci je třeba použít velkých objemů suchého přípravku,
- 2) stabilita při skladování je příliš nízká, takže suché přípravky se musejí použít během několik málo týdnů, pokud je nemožné skladování za technicky obtížných podmínek,
- 3) suché přípravky mají vysoký obsah prachu, což ztěžuje jejich zpracování,
- 4) mechanická stabilita je velmi nízká, takže při míchání přípravku s minerálními přísadami se vytváří velmi jemný abradovaný materiál, přičemž lze pozorovat oddělování tuhého přípravku,
- 5) rychlost rozpouštění suchých přípravků není uspokojivá, takže požadované mikrobiologické způsoby výroby potravin nebo krmiv se rozbíhají pouze pomalu, přičemž je dána nežádoucím mikroorganismům možnost množení, což může vést k významným ztrátám kvality.

Výrobní způsoby dosud v dosavadním stavu techniky známé obzvláště dosud popsané způsoby sušení rozprašováním, jsou také neuspokojivé z alespoň jednoho z následujících důvodů:

- 1) způsoby jsou technicky velmi složité,
- 2) míra přežití mikroorganismů při sušení je velmi nízká,
- 3) obsah vlhkosti suchého produktu je velmi vysoký.

Podstata vynálezu

Prvním předmětem předloženého vynálezu je tedy poskytnutí zlepšených suchých kultur mikroorganismů, které v podstatě již nemají výše uvedené nevýhody známé z dosavadního stavu techniky. Obzvláště mají být poskytnuty zákvasné kultury, které jsou zlepšeny ve srovnání s dosavadním stavem techniky. Zákvasné kultury podle předloženého vynálezu jsou zvláště míněny k umožnění zlepšené výroby siláže.

Druhým předmětem předloženého vynálezu je poskytnutí zlepšených způsobů výroby suchých kultur mikroorganismů. Obzvláště má být poskytnut zlepšený způsob sušení rozprašováním kultur mikroorganismů, který umožňuje výrobu suchých přípravků, které mají vysoký obsah životaschopných mikroorganismů a vysokou stabilitu při skladování.

Výše uvedeného předmětu se dosáhne poskytnutím suché kultury mikroorganismů, která obsahuje alespoň 1 druh

mikroorganismu ve formě navázané na nosič, kde je kultura přítomna ve formě částic, které:

- a) mají velikost částice alespoň okolo 0,1 mm a
- b) jsou slisovány.

Částicové kultury podle tohoto vynálezu jsou v podstatě prosty prachu díky zvolené velikosti částic. Obsah prachu je výhodně v rozmezí od asi 0,01 do 0,05 % hmotnostního, vztaženo k celkové hmotnosti suché kultury. To odpovídá prachovému indexu v rozmezí od asi 1 do 12, stanoveno gravimetricky přístrojem Casella.

Částice podle tohoto vynálezu mají dále slisovanou, tj. kompaktní, strukturu. Toho se výhodně dosáhne při jejich výrobě lisovacím krokem, který je vysvětlen detailněji dále, přičemž dosud nebyl pro suché přípravky mikroorganismů popsán. Při tomto procesu se získaný předběžný produkt, například sušením rozprašováním, lyofilizací nebo sušením v lóži ve vznosu (jako je práškový koncentrát, který lze získat variantou sušení rozprašováním podle tohoto vynálezu, a která je popsána dále), který má obvykle významný obsah prachu (např. prachový index od asi 25 do 100), mechanicky slisuje.

Lisování se může provádět například zhutňováním práškovitého předběžného produktu působením lineárních sil, např. v rozmezí od asi 5 do asi 25 kN/cm, obzvláště od asi 10 do asi 15 kN/cm, například v obvyklých lisovacích přístrojích. Předběžný produkt může však být také tabletován působením tlaků v rozmezí od asi 50 o asi 250 Mpa, obzvláště v rozmezí od 80 do 200 Mpa, jako jsou například tlaky od asi

90 do asi 160 Mpa, například v obvyklých tabletovacích lisech. Obzvláštní výhodu má lisování zhutňováním. Navíc výhodu má zhutňování práškových koncentrátů získaných podle tohoto vynálezu sušením rozprašováním.

Poskytnutí kultur mikroorganismů výše popsaného typu překvapivě vede k tomu, že zpracování, obzvláště jako zákvasné kultury, je výrazně zjednodušeno a navíc se výrazně sníží mechanická stabilita částic a tedy nebezpečí oddělení přípravků zákvasné kultury. Překvapivě bylo také nalezeno, že sisovní práškovitého předběžného produktu v podstatě nezhoršuje kvalitu produktu s ohledem na počet životaschopných mikrobů. Spíše se díky dosažené vysoké hustotě vstup vzduchu a vlhkosti do suchých přípravků podle tohoto vynálezu významně sníží takovým způsobem, že lze dosáhnout výrazného zlepšení stability při skladování. Například se tedy dosáhne míry přežití 60 a více % po skladování po dobu jednoho roku při teplotě místnosti. Výhodná data stability při skladování tohoto typu nebyla dosud popsána.

Obzvláště mohou slisované částice zahrnovat zhutněný rozdrcený materiál (tj. materiál získaný rozmělnováním s nebo bez třídění extrudátů slisovaného produktu), který má průměr od asi 0,1 mm do asi 2 mm, výhodně od 0,3 mm do 1,25 mm. Zde uvedený průměr je hodnotou vypočítanou z celkového rozložení hmoty slisovaných částic a odpovídá průměru kuliček shodné hmoty. Délka částic od kraje ke kraji je v rozmezí od asi 0,1 do 2 mm, obzvláště od asi 0,1 do 1,4 mm.

Slisované částice mohou dále být přítomny jako tablety jakéhokoli požadovaného tvaru, jako je kruhový, víceúhlý nebo oválný, s průměrem od asi 2 do 50 mm a

s poměrem průměru k tloušťce od asi 1:0,1 do asi 10:1, obzvláště od asi 1:1 do asi 5:1.

Podle dalšího výhodného ztělesnění tohoto vynálezu obsahují suché kultury mikroorganismů jako další složku šumivou přísadu, která zahrnuje kyselinovou složku, jako je organická netěkavá karboxylová kyselina, a složku tvořící plyn, jako je složka tvořící oxid uhličitý. Šumivé formulace tohoto typu mají obzvláštní výhodu spočívající v tom, že se po aplikaci zákvasné kultury překvapivě rychle rozpouštějí. Důsledkem tohoto rychlého rozpouštění zákvasné kultury v jejím obklopujícím prostředí je zajištěno rychlé množení mikroorganismů zákvasné kultury, důsledkem čehož může být překvapivě dobře zabráněno ztrátám kvality produktu, ke kterým při použití zákvasné kultury dochází.

Výhodně obsahuje suchá kultura slisovaná podle tohoto vynálezu jako nosič alespoň jeden matricový materiál k uložení buněk mikroorganismů s nebo bez alespoň jedné další přísady, která stabilizuje buňky.

Nosič použitý v suchých kulturách podle tohoto vynálezu obsahuje alespoň jednu matricovou složku přidanou jako spoluformulující činidlo před sušením k obvykle čerstvě vypěstovaným mikroorganismům, zvolenou z mono-, oligo- a polysacharidů, polyolů, polyetherů, polymerů, jako jsou CMC nebo PVP, oligo- a polypeptidů z přírodních zdrojů, jako je mléko, maso nebo obiloviny, odvozené látky nebo smíšené látky, jako je prášek ze syrovátky, pšeničné semolinové otruby, pepton, alginaty a minerální sloučeniny, nebo směsi takových matricových látek. Navíc mohou být spolu s matricovými látkami nebo později přidány přísady, které mají stabilizující účinek, například antioxidanty, jako je

α -tokoferol nebo kyselina askorbová, nebo jejich směsi. dále se může stabilizujícího účinku dosáhnout jinými látkami, které jsou zvoleny z anorganických solí, jako jsou chloridy alkalického kovu nebo chloridy kovu alkalických zemin, anorganické nebo organické pufrы, jako je fosfátový pufr alkalického kovu, aminokyseliny, jako je kyselina asparagová nebo glutamová a jejich soli, organické karboxylové kyseliny, jako je kyselina citrónová, organická netěkavá rozpouštědla, jako je DMSO, a jiné sloučeniny, jako je β -karoten, a jejich směsi.

Kultury mikroorganismů podle tohoto vynálezu výhodně obsahují životaschopné mikroorganismy v koncentraci 10^8 až 10^{12} cfu (kolonie formující jednotky)/g suché kultury. Práškové koncentráty vyrobené podle tohoto vynálezu obsahují od asi $5 \cdot 10^8$ do $1 \cdot 10^{12}$, výhodně okolo $4 \cdot 10^{11}$ do $8 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Slisované kultury podle tohoto vynálezu obsahují od asi $1 \cdot 10^{11}$ do $4 \cdot 10^{11}$, obzvláště okolo $3 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Zákvasné kultury k výrobě siláže obsahují od asi 1 do $7 \cdot 10^{10}$, obzvláště okolo $3 \cdot 10^{10}$ cfu/g.

V tomto způsobu mohou být mikroorganismy odvozeny z jednoho nebo z několika druhů mikroorganismů. Obzvláště výhodnými druhy jsou bakterie tvořící kyselinu mléčnou, jako jsou bakterie, které jsou vhodné pro tvorbu siláže, jako je například *Lactobacillus plantarum*.

Pro účely tohoto vynálezu obsahuje siláž krmné rostlinné produkty, které jsou konzervovány působením mikroorganismů, například rostlinné produkty založené na trávě, jeteli, slámě, zrninách, krmné řepě, luštěninách, obilovinách, jako je kukuřice a pšenice, apod.

Druhého předmětu předloženého vynálezu popsaného výše se překvapivě dosáhne tím, že se poskytne způsob sušení rozprašováním k výrobě suché kultury mikroorganismů, která obsahuje alespoň jeden druh mikroorganismu ve formě navázané na nosič, který zahrnuje

- a) rozpouštění nebo suspendování alespoň jedné látky vhodné pro tvorbu nosiče v kapalině obsahující alespoň jeden druh mikroorganismu,
- b) sušení výsledné směsi v rozprašovací sušičce, pro použití při sušení rozprašováním je upravený sušený plyn zahřát na teplotu v rozmezí více než 80 °C, obzvláště od asi 90 do 135 °C, výhodně od asi 100 do asi 110 °C, jako okolo 105 °C, a
- c) odstranění sušeného materiálu z rozprašovací sušičky, tento vysušený materiál má výstupní teplotu od asi 40 do 85 °C, obzvláště od asi 45 do 75 °C, výhodně od asi 50 do 65 °C, jako okolo 55 °C.

Tento způsob sušení rozprašováním podle tohoto vynálezu se také dále nazývá způsob sušení rozprašováním navázaný na nosiči. Plyn použitý pro sušení je výhodně sušený plyn, který má rosný bod pod +5 °C, obzvláště má rosný bod od asi -10 do asi -50 °C, jako je upravený stlačený vzduch nebo upravený dusík. Může být použit například stlačený vzduch, který má rosný bod okolo -25 °C a dusík, který má rosný bod okolo -40 °C. Rosný bod +5 °C je ekvivalentní zhruba 5 g vody na kubický metr vzduchu.

Podle výhodného ztělesnění způsobu sušení rozprašováním podle tohoto vynálezu se dalším krokem sušení d)

sušený materiál vystaví dosušování. Teplota dosušování je v rozmezí od asi 15 do 50 °C, jako od asi 25 do 40 °C. Dosušování se provádí například v plynné atmosféře nebo ve vakuu, alternativně k těmto způsobům existuje ještě možnost homogenního mísení exsikantu se suchým přípravkem mikroorganismů získaným podle kroku c).

Díky svému uspořádání umožňuje překvapivě způsob sušení rozprašováním posle tohoto vynálezu, aby suspenze mikroorganismů byly sušeny s mírou přežití až 100 %. Díky použití upraveného plynu při sušení rozprašováním stejně jako případného kroku dosušování jsou překvapivě poskytnuty suché přípravky mající extrémně nízký obsah vlhkosti (od asi 2 do 3 % hmotnostních vody), což odpovídá aktivitě vody a_w od 0,03 do 0,15. To přímo způsobuje, že kultury mikroorganismů, které byly sušeny rozprašováním podle tohoto vynálezu s nebo bez dosušování, mají po době skladování 1 rok při teplotě místnosti a ve vzduchu přítomném v místnost míry přežití až 60 %.

Díky překvapivě vysoké míře přežití při výše popsaném sušení rozprašováním je obsah životaschopných mikroorganismů výrazně vysoký. Výsledný produkt sušený rozprašováním se tedy také nazývá práškový koncentrát a ke snížení koncentrace životaschopných buněk může být dále ředěn, což závisí na oblasti použití. Práškový koncentrát je obzvláště vhodný k přípravě výše popsaných slisovaných částicových kultur podle tohoto vynálezu.

Předložený vynález se tedy také týká způsobu výroby výše popsaných slisovaných kultur mikroorganismů, který zahrnuje:

- i) výrobu práškového koncentrátu kultury mikroorganismů sušením rozprašováním na nosiči, lyofilizací na nosiči nebo sušení v lóži ve vznosu na nosiči,
- ii) mísení práškového koncentrátu s jednou nebo více spoluformulujícími složkami nebo bez takového mísení a
- iii) lisování takové směsi zhutňováním nebo tabletováním.

Výhodně v dalším kroku zpracování se slisované směs rozvolní, tj. rozmělní, a může se roztrždit k poskytnutí slisovaných granulí požadované velikosti za použití síta s vhodnou velikostí ok.

Předložený vynález se dále týká způsobu výroby suché hrudkované kultury mikroorganismů, který zahrnuje:

- i) výrobu práškového koncentrátu kultury mikroorganismů sušením rozprašováním na nosiči, lyofilizací na nosiči nebo sušení v lóži ve vznosu na nosiči,
- ii) mísení práškového koncentrátu s jednou nebo více spoluformulujícími složkami nebo bez takového mísení a
- iii) lisování takové směsi hrudkováním.

Vázaný na nosič zde znamená přítomnost alespoň jednoho matricového materiálu výše popsaného typu během sušení.

Podle výhodného ztělesnění výše popsaného zhutňovacího způsobu nebo tabletovacího způsobu nebo

hrudkovacího způsobu, provádí se krok i) obzvláště podle výše popsaného způsobu sušení rozprašováním.

Produkt získaný výše popsanými způsoby lisování je, pro účely předloženého vynálezu, také nazýván slisovaný nebo zhutněný suchý koncentrát (v rozmezí cfu od asi 1.10^{10} do 1.10^{11}) a může se prodávat jako takový, např. jako koncentrovaná zákvasná kultura.

Předložený vynález se dále týká použití slisovaných kultur mikroorganismů podle tohoto vynálezu jako zákvasných kultur k výrobě potravin, jako je výroba mléčných produktů, jako jsou kyselá smetana, podmáslí, jogurt, kefír, kumis, tvaroh, a při přípravě kvásku a při konzervaci nevařených salámů a při výrobě krmiv, jako je siláž. K tomuto účelu se kultura s ředěním nebo bez něj smísí se substrátem potravinou nebo se substrátem krmiva. Pokud by měl být počet buněk v zákvasné kultuře příliš vysoký, může se naředit, např. smísením s inertní tuhou látkou, jako je vápno, obzvláště pískové vápno.

Předložený vynález se dále týká potravin a krmiv, které jsou vyrobeny za použití zákvasných kultur podle tohoto vynálezu.

Předložený vynález je detailněji popsán v dílech, které nyní následují s odkazem na doprovázející obrázek.

Obr. 1 diagramaticky ukazuje možný způsob výroby, z práškového koncentrátu, granulí zhutněných podle tohoto vynálezu.

Použitelné mikroorganismy

Předložený vynález není v principu omezen na určité kultury mikroorganismů. Odborník v oboru spíše zjistí, že předložený vynález je použitelný na jakýkoli mikroorganismus, obzvláště bakterie a kvasinky, který může být převeden na suchý přípravek mikroorganismů za podmínek popsanych v předloženém popisu. Vhodnou skupinou mikroorganismů, která může být použita podle tohoto vynálezu, je skupina bakterií produkujících kyselinu mléčnou. Obzvláště jsou tyto bakterie vhodné pro homofermentativní fermentaci kyseliny mléčné, tj. štěpení glukózy na laktát cestou fruktózabisfosfátu. Typickými představiteli této skupiny jsou bakterie rodu *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. a *Pediococcus* sp. Příklady koncentrátů laktobacilů, které mohou být zmíněny, jsou *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbruecki*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum*. Příklady vhodných streptokoků jsou *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus faecalis* a *Streptococcus faecium*, a příklady vhodných pediokoků jsou *Pediococcus cerevisiae* a *Pediococcus acidilactici*.

Fermentace mikroorganismů

K provedení předloženého vynálezu se výhodně využijí čerstvě připravené suspenze mikroorganismů. Fermentační prostředí nebo podmínky fermentace optimální pro každý mikroorganismus jsou v oboru buď známy nebo mohou být

odborníkem v oboru pověřeným prací s kulturou mikroorganismů stanoveny během několik rutinních experimentů.

Obvykle se však fermentace provádí takovým způsobem, že se vychází z kapalně nebo polotuhé předběžné kultury (objem kultury od asi 10 do 200 ml), čerstvě připravené sterilní fermentační prostředí se inokuluje za sterilních podmínek, kde volumetrický poměr předběžné kultury ke kultivačnímu prostředí může být od asi 1:50 do 1:200. Výhodně se použijí čerstvě vypěstované předběžné kultury, které jsou v pozdní fázi logaritmického růstu. V závislosti na kultivovaném mikroorganismu, kultivují se za specifických optimalizovaných růstových podmínek (jako je teplota a hodnota pH). Obvykle je kultivační teplota v rozmezí od asi 20 do 40 °C, ale například pokud se kultivují termofilní bakterie, mohou být přítomny výrazně vyšší teploty. Fermentační várka se udržuje při jednotném pohybu, například pomocí mírného míchání nebo zaváděním vzduchu nebo dusíku k zabránění vývoje teplotních nebo látkových gradientů a tímto způsobem k zajištění kontinuálního růstu. Po ukončení růstové fáze (stanoví se například dosažením definované hustoty buněk nebo spotřebou některé z přidaných živin), může se buněčná suspenze použít přímo k výrobě suchých přípravků podle tohoto vynálezu.

Je však také možno koncentrovat výslednou suspenzi původních buněk ke zvýšení počtu buněk. K tomu jsou vhodnými způsoby například odstředování, ultrafiltrace nebo odpařování na tenkém filmu. Obvykle se však ke koncentraci buněčné suspenze používá krok odstředování, kterýžto krok odstředování se výhodně provádí při snížené teplotě, která je řekněme v rozmezí od asi 4 do 10 °C.

Místo koncentrace nebo v kombinaci s ní existuje také možnost vystavení suspenze čerstvě kultivovaných buněk kroku promývání k odstranění složek kultury, jako jsou metabolické produkty, které mohou na aktivitu mít nežádoucí účinek. V tomto případě je přijatý postup takový, výhodně při teplotě od asi 4 do 10 °C, že původní bujón kultury se napřed koncentruje k získání suspenze s vysokou hustotou buněk a tato se poté vyjme vhodným pufrovacím roztokem a naředí na požadovanou hustotu buněk. Pokud je to nezbytné, promývací krok se může také několikrát opakovat. Obsahy tuhých látek, které mohou být použity podle tohoto vynálezu kultur mikroorganismů vhodných k výrobě suchých přípravků podle tohoto vynálezu jsou obvykle v rozmezí od asi 5 do 25 % hmotnostních, jako od asi 10 do 20 % hmotnostních.

Mikroorganismy mohou být kultivovány fermentací ve várkách nebo kontinuálně.

K další ilustraci vynálezu v díle uvedeném dále se poskytuje detailnější popis kultivace bakterií tvořících kyselinu mléčnou, obzvláště *Lactobacillus plantarum*. To je bakterie, která se dá nalézt obzvláště na intaktních a rozkládajících se rostlinách a je obzvláště vhodná pro výrobu silážních krmiv.

Vhodné fermentační prostředí obsahuje, na litr prostředí, od asi 40 do 60 g glukózy, od asi 30 do 60 g kvasinkového extraktu a směs obvyklých stopových prvků, jako je hořčík, mangan a případně železo. Hodnota pH fermentačního prostředí je od asi 6 do 7. Fermentační teplota je od asi 33 do 38 °C. Hodnota pH fermentačního prostředí se může udržovat uvnitř požadovaného rozmezí přidáním sterilního roztoku

hydroxidu sodného. Růst je ukončen, pokud se nedá pozorovat další spotřeba glukózy nebo syntéza kyseliny mléčné.

Podle varianty fermentace laktobacilu, která je vhodná podle tohoto vynálezu, po dosažení okolo 80 nebo 90 % růstu se teplota fermentačního prostředí zvýší na od asi 42 do 46 °C, dokud se přidaná glukóza úplně nespotřebuje. Bylo podle tohoto vynálezu nalezeno, že kultury vytvořené tímto způsobem jsou obzvláště stabilní zvláště při sušení rozprašováním, čehož důsledkem se dají dosáhnout vysoké míry přežití. Srovnatelné varianty růstu jsou také možné s jinými mikroorganismy, které mohou být použity podle tohoto vynálezu.

Po ukončení růstu se fermentační várka upraví na požadovanou hustotu buněk. Pokud je to požadováno, může se buněčná suspenze promývat dokud není v podstatě prosta laktatu. Vhodný počet buněk suspenze mikroorganismů podle tohoto vynálezu je obvykle v rozmezí od asi $1 \cdot 10^{10}$ do asi $5 \cdot 10^{12}$ cfu/g suspenze.

Nosičové látky

Suché kultury mikroorganismů připravené podle tohoto vynálezu vedle jakýchkoli netěkavých složek pocházejících z příslušné fermentační várky, jako jsou metabolické produkty, obsahují alespoň jeden matricový materiál s jinými stabilizačními látkami nebo bez nich. tyto spoluformulující látky jsou výhodně zvoleny z anorganických solí nebo pufrů, alespoň jedné další sloučeniny, která je zvolena z mono-, oligo- a polysacharidů, polyolů, polyetherů, aminokyselin, oligo- a polypeptidů, sloučenin odvozených z mléka, organických karboxylových kyselin, minerálních

sloučenin, organických nosičových materiálů, jako jsou pšeničné semolinové otruby, alginaty, DMSO, PVP (polyvinylpyrrolidon), CMC (karboxymethylcelulóza), α -tokoferol, β -karoten, a jejich směsi.

Příklady vhodných sacharidových nosičových složek jsou sacharóza, fruktóza, maltóza, dextróza, laktóza a maltodextrin. Příkladem vhodného polyolu je glycerol. Příklady vhodných aminokyselin jsou kyselina glutamová, asparagová a jejich soli. Příkladem vhodného peptidového nosiče je pepton. Příkladem sloučeniny odvozené z mléka je vedle výše zmíněného maltodextrinu také syrovátkový prášek. Vhodnými organickými karboxylovými kyselinami jsou například kyselina citrónová, kyselina jablečná a kyselina L-askorbová. Příklady vhodných minerálních nosičů jsou montmorillonit a palygorskit.

Výhodně se však jako nosič suchých přípravků mikroorganismů podle tohoto vynálezu použijí směsi výše zmíněných tříd látek. Směsi tohoto typu výhodně obsahují jako hlavní složku matricový materiál, jako je jedna z výše zmíněných sacharidových složek nebo například syrovátkový prášek s menším dílem alespoň jedné další složky, jako je pufrová složka (například kyselina citrónová) nebo anti-oxidans (například kyselina L-askorbová nebo α -tokoferol), nebo bez něj. Přidání další stabilizující složky, jako je glutamat sodný a/nebo pepton, je obdobně prokázáno jako výhodné.

Matricová složka je obvykle použita v nosičových kompozicích použitelných podle tohoto vynálezu v asi 5- až 30-násobném množství jiných nosičových složek. Příklady obzvláště vhodných nosičových kombinací jsou:

- a) syrovátkový prášek/kyselina citrónová/kyselina L-askorbová (hmotnostní poměr okolo 40:1:1),
- b) maltodextrin/laktóza/kyselina citrónová/kyselina L-askorbová (hmotnostní poměr okolo 20:20:1:1), nedoplňováno nebo doplňováno asi 1,5 díly β -karotenu a 0,5 díly α -tokoferolu na díl kyseliny citrónové,
- c) maltodextrin/glutamat sodný/kyselina L-askorbová (hmotnostní poměr okolo 10:1,5:1),
- d) laktóza/glukóza/pepton/kyselina citrónová (hmotnostní poměr okolo 6:6:1,2:1).

Nosičové látky podle tohoto vynálezu mohou být přidány k suspenzi mikroorganismů buď jako tuhá látka nebo v rozpuštěné formě. Výhodně se však připraví sterilní roztok nosiče/nosičů, ten se ochladí na teplotu od 4 do 10 °C a takový se smíchá s obdobně ochlazenou suspenzí mikroorganismů za mírného míchání. K přípravě homogenní suspenze se výsledná směs míchá, přičemž se dále chladí po dobu od asi 10 minut do 1 hodiny.

Příprava suchých přípravků mikroorganismů

Suspenze mikroorganismů obsahující nosič přidaný způsobem popsáným výše se může vysušit různými způsoby. Vhodnými způsoby sušení jsou v principu lyofilizace, sušení v lóži ve vznosu a výhodně sušení rozprašováním. Pro účely předloženého vynálezu sušení rozprašováním také zahrnuje upravené způsoby sušení rozprašováním, jako je hrudkování

rozprašováním nebo hrudkovací sušení rozprašováním. Posledně zmíněný způsob je také znám pod názvem způsob FSD (sušička zkapalněného rozprašku).

Lyofilizace pro přípravu suchých kultur mikroorganismů podle tohoto vynálezu se může poádět například na základě způsobu lyofilizace popsaného v EP-A-0 259 739 nebo US-A-3 897 307. Obsahy těchto publikací jsou zde zahrnuty zcela formou odkazu.

Vhodný způsob sušení v lóži ve vzosu je popsán například v disertační práci U.Kesslerera na téma „Experimentelle Untersuchung und Modellierung der Überlebensrate vom Milchsäurebakterien bei der thermischen Trocknung“ (Experimentální studie a modelování míry přežití bakterií tvořících kyselinu mléčnou během tepelného sušení), Mnichovská technická univerzita, 1993. Obsah této publikace je obdobně zahrnut zcela formou odkazu. K provádění způsobu sušení v lóži ve vzosu je výhodné, když nosičový materiál, který má být použit, obzvláště matricová složka, je zaveden do lóže ve vzosu a na něj je rozprašována suspenze mikroorganismů způsobem popsaným U. Kesslererem.

Nejvýhodnějším způsobem sušení podle tohoto vynálezu je však sušení rozprašováním. Tyto postupy, které mohou být použity podle tohoto vynálezu, jsou v podstatě všechny technikami sušení rozprašováním dosud známými. Materiál, který má být rozprašován může například být sušen souběžně nebo protiběžně, rozprašování se může provádět prostřednictvím jednosložkové nebo vicesložkové hubice nebo prostřednictvím rozprašovacího kola.

Vynález dává přednost použití materiálu, který má být rozprašovaná, který má obsah tuhých látek (po přidání nosiče) od asi 10 do 40 % hmotnostních, jako od asi 10 do 25 % hmotnostních.

Způsob sušení rozprašováním podle tohoto vynálezu se provádí takovým způsobem, že upravený suchý plyn, který má teplotu v rozmezí nad asi 80 °C se vhání do sušícího přístroje. Obzvláště by měla vstupní teplota být v rozmezí od asi 90 do 135 °C. Obzvláštní výhodu má teplota sušení v rozmezí od asi 105 °C. Rychlost způsobu sušení je podle předloženého vynálezu určena tak, že výstupní teplota sušeného materiálu ze sušárny je v rozmezí od asi 45 do 75 °C, obzvláště v rozmezí od asi 50 do 65 °C, výhodně okolo 55 °C.

Obzvláštní důležitost pro způsob podle tohoto vynálezu má použití předem upraveného sušícího vzduchu, tj. vzduchu s nízkou vlhkostí. Výhodně se použije stlačený vzduch, který má rosný bod při teplotě okolo -25 °C.

Způsob sušení podle tohoto vynálezu se provádí takovým způsobem, že v suchém materiálu je přítomen velmi nízký obsah zbytkové vlhkosti. Výhodně by měla být aktivita vody a_w v sušeném materiálu menší než 0,4. K dalšímu zlepšení stability při dlouhodobém skladování by podle předloženého vynálezu měly být hodnoty aktivity vody menší než 0,15, výhodně jsou vyhledávány hodnoty v rozmezí od 0,03 do 0,1. Procento obsahu vody je výhodně od asi 2 do 3 % hmotnostních. Nejvýhodněji se toho dosáhne přidáním dosušovacího kroku následně po kroku sušení rozprašováním. Sušený materiál se pro tento účel například dosuší v lóži ve vzhledu, výhodně při teplotě v rozmezí od 15 do 50 °C, po dobu například od 15

minut do 20 hodin. Výhodně opět jako sušicí plyn slouží upravený stlačený vzduch nebo upravený dusík. Dosušování se však může provádět použitím vakua od asi 133,3 do 666,5 Pa po dobu od asi 15 minut do 20 hodin a při teplotě od asi 15 do 50 °C. V tomto případě je výhodné míchání sušeného materiálu například za použití lopatkového míchadla.

Místo výše popsaných fyzikálních dosušovacích postupů je rovněž možné k suchému materiálu získanému sušením rozprašováním přidat specifická exsikancia. Exsikancia tohoto typu by měla sama mít velmi nízkou aktivitu vody, jako je a_w 0,01 nebo nižší. Příklady vhodných exsikancií jsou anorganické soli, jako je chlorid vápenatý a uhličitán sodný, organické polymery, jako je produkt, který lze získat pod obchodním jménem Kollidion 90 F, a exsikancia obsahující oxid křemičitý, jako je silikagel, zeolity a exsikancia, která lze získat pod obchodním jménem Tixosil 38, Sipernat 22 S nebo Aerosil 200.

Podle tohoto vynálezu bylo překvapivě nalezeno, že navzdory relativně vysokým teplotám sušení má míra přežívání u suchých přípravků podle tohoto vynálezu vynikající hodnoty, jmenovitě $75\% \pm 25\%$.

Obsah životaschopných mikroorganismů je v rozmezí od asi $5 \cdot 10^8$ do $1 \cdot 10^{12}$ cfu/g suché hmoty. Tyto přípravky se také podle tohoto vynálezu nazývají práškové koncentráty. Jelikož jsou pro individuální konečnou aplikaci rovněž plně dostačující nižší obsahy životaschopných mikroorganismů, mohou tedy práškové koncentráty tohoto typu pokud je to příhodné být namíseny na konečný počet životaschopných mikroorganismů mísením s dalším inertním nosičovým materiálem.

Příprava lisovaných suchých kultur mikroorganismů

Práškové koncentráty, které se dají získat výše popsaným způsobem sušení, mají obvykle relativně vysoký obsah prachu a nelze tedy s nimi ještě uspokojivě nakládat při individuální aplikaci. Navíc různé aplikace vyžadují zvýšenou mechanickou stabilitu suchých kultur. Je tedy nezbytné zlepšit vlastnosti výše popsaných práškových koncentrátů dalším lisovacím krokem.

Ke snížení obsahu prachu v práškových koncentrátech podle tohoto vynálezu je možné hrudkovat tyto koncentráty obvyklým způsobem k vytvoření granulí nebo za použití externích sil k jejich zhutnění nebo tabletování.

Hrudkování je obecně známým postupem, přičemž jej popsal například Schade A. a Leuenberger H. v Continuous fluidized-bed spray granulation, Chemie Ingenieur Technik, 64, 1016 (1992), Uhleman H., Preparation of pharmaceutical granules in a combined wet granulation a multichamber fluidized-bed drying process, Chemie Ingenieur Technik, 62, 822 (1990) nebo Rosch M. a Probst R., Granulation in the fluidized bed, Verfahrenstechnik, 9, 59 (1975).

Podle tohoto vynálezu může být užitečné hrudkování za použití mixéru. K tomuto účelu se výše popsaný práškový koncentrát umístí do mixéru do nějž se rozprašuje olej, voda nebo vodný nebo alkoholický roztok cukrů, polymerů nebo jiných přísad k hrudkování práškového koncentrátu.

Podle tohoto vynálezu může být navíc užitečné hrudkování v lóži ve vznosu. V tomto případě se práškový

koncentrát vortexuje s plynovou náplní a rozprašuje se s vodným nebo alkoholickým roztokem cukrů, polymerů nebo jiných přísad k vytvoření hrudek. Vhodné způsoby k tomuto účelu jsou popsány například ve WO-A-88/06181, v disertační práci U. Kesslerera (citováno výše) a K. Fuchse v ZFL 45 (1994) 31. Poznátky výše zmíněných publikací jsou zde zahrnuty formou odkazu.

Hrudkování vede ke vzniku granulovaných kultur mikroorganismů, které mají velikost částice v rozmezí od asi 0,1 do asi 4 mm, obzvláště od asi 0,3 do 2,5 mm.

Obzvláště výhodnou podle tohoto vynálezu je však příprava suchých kultur mikroorganismů, které jsou přítomny ve formě obzvláště vysoce slisovaných částic. To se provádí podle tohoto vynálezu buď tabletováním v obvyklých tabletovacích lisech nebo za použití obvyklých zhutňovacích přístrojů vybavených dvěma proti sobě běžícími válci.

Ke slisování práškových koncentrátů, které se dají získat podle tohoto vynálezu, se k nim obvykle přidává jedno nebo více spoluformulujících činidel nebo přísad k pozměnění zpracovatelnosti na konečný produkt nebo vlastností konečného produktu.

Ke zlepšení tekutosti práškového koncentrátu se výhodně přidá volně tekoucí činidlo. Příklady volně tekoucího činidla jsou prášky oxidu křemičitého sušeného rozprašováním, které se dají získat například pod obchodním jménem Sipernat 50. Ke zlepšení stability při skladování tuhých formulací podle tohoto vynálezu mohou navíc být přidána obvyklá antioxidanta, jako je kyselina L-askorbová. Dále mohou být ještě přidána exsikancia výše popsaného typu.

Účinek kultur podle tohoto vynálezu je výrazně vylepšen, pokud se přijmou opatření, která poté, co se kultura aplikuje, vedou k rychlému rozvolnění zrnité struktury a tedy k rychlému uvolnění mikroorganismů. Jednou z možností jak toho dosáhnout je přidání snadno ve vodě rozpustné složky, která tak urychlí rozvolňování zrnité struktury. Vhodnými sloučeninami jsou například polyethylen-glykoly, které se dají získat například pod obchodním jménem Pluriol E.

Další tuhá formulace obzvláště výhodná podle tohoto vynálezu obsahuje to, co je nazýváno šumivou přísadou. To je složka uvolňující plyn, obzvláště zdroj oxidu uhličitého, například hydrogenuhličitan kovu alkalických zemin, výhodně hydrogenuhličitan sodný nebo hydrogenuhličitan amonný, a kyselá složka, výhodně zvolená z kyseliny citrónové, kyseliny askorbové nebo jablečné. Tato šumivá přísada za přítomnosti vlhkosti vede ke spontánní tvorbě plynu, přičemž dochází k rozvolňování zrnité struktury a rychlému uvolňování mikrobiálních buněk.

Obzvláště je radno k přípravě vysoce slisovaných, zhutněných nebo tabletovanych kultur mikroorganismů přidat zhutňovací nebo tabletovací pomocné látky. Tomu tak je proto, že podle tohoto vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že přidání takových zhutňovacích pomocných látek snižuje tlaky působící na mikroorganismy během zhutňování a tedy výrazně zlepšuje míru přežití mikrobů. Příklady vhodných zhutňovacích pomocných látek jsou mikrokystalická celulóza, cukry a jejich směsi. Konkrétními příklady mikrokystalické celulózy jsou produkty, které jsou komerčně dostupné pod obchodními jmény Avicel, Arbocel a Vivapur. Příklady vhodných cukrů jsou

maltózové, maltodextrinové a laktózové přípravky, které se dají získat pod obchodními jmény Granulac, Tabletosse nebo FloLac. Příkladem vhodného směsného produktu obsahujícího celulózu/cukr je komerční přípravek Cellactose. Další vhodnou tabletovací pomocnou látkou je laktózový přípravek granulovaný za použití PVP, který je k získání pod obchodním jménem Ludipreß.

Jinými vhodnými přísadami jsou polyethylenglykoly (molekulová hmotnost od 100 do 10 000), které mohou mít stabilizující účinek na buňky uložené v matrici.

Doprovodný obr. 1 ukazuje postupový diagram pro další zpracování podle tohoto vynálezu práškových koncentrátů k poskytnutí ztuhlého produktu podle tohoto vynálezu. Práškový koncentrát se smísí v mixéru M1 se spoluformulujícími složkami nebo přísadami ZU, posune se odtud do reservoáru B1, kterým se plní ztuhovač A1. Proužek produktu vystupující ze ztuhovače se předem rozmělní nebo jemně rozmělní ve struhadlech Z1 a Z2 a na síti F1, produkt PR se oddělí od prachových frakcí, které mají velikost částic menší než 0,3 mm. Tento materiál se naplní do mixéru M1 jako recyklovaný materiál RÜ. Produkt PR, který má velikost částic od 0,3 mm a výše, jako je 0,3 až 1,5 mm, se posune na balicí místo nebo se může podrobit dalšímu zpracování, jako je potahování.

Vhodnými potahovacími materiály, které jsou výhodně určeny ke zpomalení prostupu vlhkosti do suchého přípravku, jsou například alkoholické roztoky PVP, obzvláště produkt PVP, který je komerčně dostupný pod obchodním jménem Kollidon VA64. Dalším vhodným potahovacím systémem je směs šelaku a

Kollidonu 25 nebo 30, která je doplněna oxidem titaničitým a lojem, a který je obdobně přítomen v alkoholickém roztoku.

K dalšímu snížení počtu buněk, pokud je to nezbytné, může být získaný potahovaný nebo nepotahovaný produkt smísen, například s vápnem nebo jinou vhodnou minerální přísadou.

Příklady provedení vynálezu

Analytické postupy použité v následujících příkladech

a) Stanovení počtu buněk:

Počty buněk se stanoví obvyklým způsobem postupným ředěním pomocí sterilního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,9 % a následným umístěním na MRS agar (Difco Laboratories). Po inkubaci po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C se spočítají jednotky tvořící kolonii (cfu). Vyhodnotí se pouze desky, které obsahují mezi 30 a nejvýše 300 koloniemi. Obecně se vyhodnotí v jednom stupni 3 desky a vezme se střední hodnota.

Specifický počet buněk vzorku se stanoví výpočtem, dělením počtu buněk na gram vzorku relativním obsahem suché hmoty ve vzorku.

b) Stanovení míry přežití při sušení:

Míra přežití během sušení se vypočítá ze specifického počtu buněk vzorku před sušením děleño specifickým počtem buněk po sušení. Vždy se vyjadřuje v procentech.

c) Stanovení stability při skladování:

Ke stanovení stability při skladování sušeného vzorku se bezprostředně po sušení stanoví specifický počet buněk sušeného vzorku (den_0). Sušený buněčný materiál se za přístupu vzduchu delší dobu skladuje v pevně uzavřené nádobě s opaleskujícího skla při teplotě místnosti ($21\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$). Specifický počet buněk se opakovaně stanoví v pravidelných intervalech (den_y). Stabilita při skladování se vypočítá z kvocientu specifický počet buněk v den_y /specifický počet buněk v den_0 .

Pokud je specifický počet buněk po sušení například $5 \cdot 10^{11}$ cfu/g sušeného materiálu a po skladování po dobu 8 týdnů $4 \cdot 10^{11}$ cfu/g sušeného materiálu, pak je stabilita při skladování 80 % počáteční hodnoty.

d) Měření obsahu vlhkosti:

Elektronický analyzátor vlhkosti HR 73 od firmy Mettler

Postup: na miskách vah se přístroje se rozloží přibližně 2 g prášku. Měření probíhá při teplotě sušení $105\text{ }^\circ\text{C}$ až do konstantní hmotnosti (kritérium pro vypnutí: max. 1 mg ztráty hmotnosti za 50 sekund).

e) Měření vodní aktivity:

Přístroj Hygroskop DT od firmy Rotronic AG, Curych, Švýcarsko

Produkt se umístí do držáku vzorku a ten se umístí

do měřicí komory s nastavenou teplotou 25 °C. Po uzavření měřicí komory a době k dosažení rovnováhy 20 minut se odečte hodnota naměřená na přístroji.

f) Měření DSC ke stanovení teploty průchodu sklem T_g :

Přístroj TA4000 od firmy Metler

Hmotnost vzorku přibližně 15 mg, rychlost zahřívání 20 °C/min, vzorky se promývají během měření proudem dusíku.

DSC = diferenční skanovací kalorimetrie

Příklady kultur mikroorganismů

Příklad K1

Fermentace ve várce o objemu 10 litrů

10 litrů fermentačního prostředí, které obsahuje následující složky, se umístí do 14-litrové fermentační nádoby a sterilizuje se při teplotě 121 °C po dobu 30 minut:

Glukóza monohydrát	550,0 g
50% suspenze kvasinkového extraktu (pH 4,5 s kyselinou fosforečnou)	750,0 g
Tween 80®	10,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	5,0 g
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0,5 g

Po sterilizaci se prostředí upraví na pH 5,8 při teplotě 37 °C za použití sterilního roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 % a prostředí se vyčeří mírným proudem

sterilního dusíku. Fermentační nádoba se míchá frekvencí otáček 150 za minutu.

Fermentační nádoba se poté inokuluje 100 ml předběžné kultury *Lactobacillus plantarum* (kmen LU 3244 firmy BASF), která se předtím pěstuje 16 hodin při teplotě 37 °C ve vyživovacím prostředí MRS (Difco Laboratories). Hodnota pH kultury se kontinuálně udržuje na 6,2 za použití roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 %.

Průběh fermentace se sleduje podle spotřeby roztoku hydroxidu sodného. Jakmile se nespotebovává žádný roztok hydroxidu sodného (celková spotřeba 890 g), veškerý fermentační bujón se slije a při teplotě 8 °C odstředí. Biomasa se resuspenduje v okolo 600 g supernatantu a pomocí supernatantu se upraví na přesně 1 000 g. Obsah suché hmoty se stanoví za použití infračervených sušicích vah (105 °C do konstantní hmotnosti). Obsah tuhých látek této suspenze je 15 %.

Příklad K2

Fermentace ve várce o objemu 200 litrů

180 litrů fermentačního prostředí, které obsahuje následující složky, se umístí do 200-litrové fermentační nádoby a sterilizuje se při teplotě 121 °C po dobu 30 minut:

Glukóza monohydrát	11 kg
50% suspenze kvasinkového extraktu	15 kg
Tween 80®	200 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200 g
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	10 g

Po sterilizaci se prostředí upraví na pH 5,8 při teplotě 37 °C za použití sterilního roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 % a prostředí se vyčeří mírným proudem sterilního dusíku.

Fermentační nádoba se poté inokuluje 2000 ml předběžné kultury *Lactobacillus plantarum* (3244), která se předtím pěstuje 24 hodin při teplotě 30 °C ve vyživovacím prostředí MRS. Hodnota pH kultury se kontinuálně řídí za použití roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 %.

Průběh fermentace se sleduje podle spotřeby roztoku hydroxidu sodného. Celkem se spotřebuje 16,43 kg 25% roztoku hydroxidu sodného. Jakmile se nespotebováá žádný roztok hydroxidu sodného, veškerý fermentační bujón se slije a při teplotě 8 °C shromáždí pomocí kontinuálního oddělovače. Shromážděná biomasa má po odstředění hmotnost 20 kg, přičemž obsah suché tuhé hmoty této suspenze je 12,3 %. Počet buněk v suspenzi je $1,04 \cdot 10^{11}$ gfu/g suspenze. Specifický počet buněk je $8,45 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty.

Příklad K3

Fermentace ve várci s teplotním šokem

Fermentace se provádí podobným způsobem jako v příkladu 2. Při spotřebě hydroxidu sodného odpovídající 90 % očekávané hodnoty se teplota ve fermentační nádobě zvýší na 44 °C a udržuje se dokud se nespotebováá veškerý cukr. Buňky se poté shromáždí podle popisu v příkladu 2. Počet buněk ve fermentačním bujónu je $1,8 \cdot 10^{11}$ gfu/g při obsahu tuhých látek

21,17 %. To odpovídá specifickému počtu buněk $8,5 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty.

Příklad K4

Kontinuální fermentace

10 litrů fermentačního prostředí, které má následující složení, se umístí do 14-litrové fermentační nádoby a sterilizuje se při teplotě 121 °C po dobu 30 minut (produkční fermentační nádoba):

Glukóza monohydrát	400,0 g
50% suspenze kvasinkového extraktu (pH 45 pomocí kyseliny fosforečné)	500,0 g
KH_2PO_4	30,0 g
Monohydrát kyseliny citrónové	21,0 g
Tween 80®	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	1,7 g
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g

2000 litrů stejného prostředí se vlije do druhé fermentační nádoby, která má celkový objem 3000 litrů a sterilizuje se (rezervoárová, fermentační nádoba). Obě fermentační nádoby se spojí sterilizovatelnou trubicí. Prostřednictvím zprostředkovací nádoby, která je umístěna na vahaách se za použití automatického řídicího systému načerpají 3 litry čerstvého prostředí do produkční fermentační nádoby. Teplota produkční fermentační nádoby se udržuje na 37 °C. Hodnota pH se udržuje na 5,8 za použití roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 %. Obsah

fermentační nádoby se míchá při frekvenci otáček 150 za minutu a vyčeří se pomocí dusíku při 0,1 VVM.

Prostřednictvím druhého čerpadla se každou hodinu kontinuálně odebírají 3 litry prostředí a shromažďují se ve shromažďovací nádobě z nerezové oceli předem vychlazené na teplotu od 0 do 4 °C. Koncentrace biomasy se stanoví turbidimetrií a je 3,5 g/litr. Koncentrace glukózy ve výstupu z produkční fermentační nádoby je po počáteční růstové fázi v každém okamžiku 0 g/litr. Počet buněk ve fermentačním bujónu je $1,48 \cdot 10^{10}$ gfu/g bujónu. Obsah tuhých látek ve fermentačním bujónu je 6,89 %, což odpovídá 217 g suché hmoty. Specifický počet buněk je $2,15 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty.

Příklad K5

Shromažďování buněk pomocí promývacího kroku k odstranění laktatu sodného

72 litrů výstupu z fermentační nádoby z příkladu 4 e kontinuálně shromažďuje při teplotě 8 °C za použití komerčního oddělovače. Získá se okolo 7 kg buněčné suspenze. K té se přidá promývací roztok, který obsahuje 40 litrů deionizované vody, 450 g chloridu sodného a 136 g KH_2PO_4 . Hodnota pH promývacího roztoku se předem upraví na 7,0 za použití roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 25 %. Znovu se oddělí okolo 50 litrů resuspendovaných buněk. Získá se 3160 g koncentrované promyté suspenze buněk. Obsah tuhých látek v suspenzi je 9,97 %. Počet buněk je $2,49 \cdot 10^{11}$ cfu/g suspenze. Specifický počet buněk je $2,5 \cdot 10^{12}$ cfu/g suché hmoty.

Tato promytá suspenze buněk je v podstatě prosta laktatu sodného. Koncentrace biomasy stanovená turbidimetrií je 80 g/litr.

Příklady přípravy práškových koncentrátů sušením rozprašováním podle tohoto vynálezu

Experimenty se sušením rozprašováním popsané v následujícím oddíle pro přípravu práškových koncentrátů podle tohoto vynálezu se provádějí v laboratorním rozprašovacím sušiči typu Niro Minor od firmy Niro, Kodaň, Dánsko. Bakteriální suspenze připravená k rozprašování se rozprašuje prostřednictvím dvousložkové hubice souběžně s předem upraveným zahřátým stlačeným vzduchem do věže k sušení rostlin, sušený produkt se od vzduchu oddělí za použití cyklonu a shromáždí se.

Příklad S1

K přípravě roztoku spoluformulujícího činidla se 200 ml deionizované vody (zcela demineralizované vody) zahřívá na teplotu 60 °C. V ní se rozpustí 150 g syrovátkového prášku, 7,5 g chloridu sodného, 3,8 g KH_2PO_4 , 3,8 g kyseliny citrónové a 3,8 g kyseliny L-askorbové, hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 % a upraví se na 400 g celkové hmotnosti za použití deionizované vody. Tento roztok se ochladí na teplotu 5 °C.

200 ml promytého, tj. v podstatě laktatu sodného prostého, odstředěného fermentu (připraveného podobným způsobem jako v příkladu K5) (obsah tuhých látek 12,7 % (S.C.)) se umístí do ledové lázně při teplotě 5 °C a za

míchání se přidá 400 g spoluformulujícího roztoku ochlazeného na teplotu 5 °C. Směs odstředěného fermentu a spoluformulujících činidel se dále 50 minut míchá při frekvenci otáček 500 za minutu za použití magnetického míchadla při ochlazování ledovou lázní. Prostřednictvím sušení rozprašováním (přístroj Niro Minor) se směs poté převede na práškový koncentrát A, který se oddělí v cyklonu. V průběhu tohoto postupu se rezervoár, z něž se směs odměřuje, chladí na teplotu 4 °C, vstupní teplota je od 105 do 110 °C, výstupní teplota je od 53,5 do 55,5 °C. K rozprašování směsi odstředěného fermentu a spoluformulujících činidel se použije dvousložková hubice a upravený vzduch (rosný bod -25 °C) při tlaku 400 kPa.

Práškový koncentrát A se dále suší při teplotě místnosti po dobu 2 hodin v lóži ve vzosu poháněném dusíkem (rosný bod -40 °C), čímž se získá práškový koncentrát B.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování: 35 % S.C., $2,84 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: aktivita vody $a_w = 0,135$

Práškový koncentrát B: aktivita vody $a_w = 0,076$

obsah vlhkosti 3,4 %

T_g z měření DSC: 54 °C, $1,98 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (odpovídá 70% míře přežití při sušení)

Stabilitní studie při

skladování koncentráту B: počty cfu při skladování při teplotě místnosti v nádobách uzavřených po okolním vzduchem:

-35-

2,0.10¹¹ cfu/g suché hmoty (100 %)

po 30 dnech

Příklad S2

K přípravě roztoku spoluformulujícího činidla se 200 ml deionizované vody zahřívá na teplotu 70 °C. V ní se rozpustí 75 g maltodextrinu (Glucidex IT6, Roquette), 75 g laktózy, 7,5 g chloridu sodného, 3,8 g KH₂PO₄, 3,8 g kyseliny citrónové a 3,8 g kyseliny L-askorbové, hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 % a upraví se na 400 g celkové hmotnosti za použití deionizované vody. Tento roztok se ochladí na teplotu 5 °C.

200 ml promytého, tj. v podstatě laktatu sodného prostého, odstředěného fermentu (16,5 % S.C., připraveného podobným způsobem jako v příkladu K5) se vmísí za míchání do 400 g spoluformulujícího roztoku ochlazeného na teplotu 5 °C. Směs se 30 minut míchá při frekvenci otáček 250 za minutu za použití magnetického míchadla při ochlazování ledovou lázní. Poté se přidá 101 ml solubilizované směsi připravené podle EP-A-0 479 066 (BASF) sestávající z 25% Tween 80, 5% β-karotenu a α-tokoferolu a dále se 10 minut míchá při ochlazování ledovou lázní. Tato směs se převede sušením rozprašováním, jak je popsáno v příkladu S1, na práškový koncentrát A (vstupní teplota je 105 °C, výstupní teplota je od 54 do 55 °C). Práškový koncentrát A se dále nesusí.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování:

29 % S.C., 3,84.10¹¹ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: aktivita vody $a_w = 0,065$
obsah vlhkosti 2,8 %
 T_g z měření DSC: $61\text{ }^\circ\text{C}$, $2,22 \cdot 10^{11}$ cfu/g
suché hmoty (ekvivalentní 58% míře
přežití při sušení)

Stabilitní studie při

skladování koncentrátu A: počty cfu při skladování při
teplotě místnosti v nádobách
uzavřených po okolním vzduchem:
 $1,9 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (86 %)
po 30 dnech

Příklad S3

400 ml nepromytého, tj. obsahujícího laktat sodný, odstředěného fermentu (připraveného podobně jako v příkladu K4) (14,3 % S.C.) se umístí do ledové lázně při teplotě $5\text{ }^\circ\text{C}$. Do chlazeného odstředěného fermentu se za míchání magnetickým míchadlem při frekvenci otáček 700 za minutu vmísí 57,2 g přípravku Glucidex IT6, 8,6 g kyseliny L-askorbové a 5,7 % glutamatu sodného jako tuhé látky. Hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 %. Směs odstředěného fermentu a spoluformulujících činidel se dále míchá 30 minut při frekvenci otáček 500 za minutu za použití magnetického míchadla při teplotě přibližně $3\text{ }^\circ\text{C}$ za chlazení v ledové lázni. Tato směs se poté převede sušením rozprašováním, jak je popsáno v příkladu S1, na práškový koncentrát A (vstupní teplota je $105\text{ }^\circ\text{C}$, výstupní teplota je od $54,5$ do $55,5\text{ }^\circ\text{C}$).

Práškový koncentrát A se dále suší při teplotě místnosti po dobu 2 hodin v lóži ve vznosu poháněném dusíkem, čímž se získá práškový koncentrát B.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování: 27 % S.C., $4,65 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: aktivita vody $a_w = 0,197$

Práškový koncentrát B: aktivita vody $a_w = 0,072$

obsah vlhkosti 3,8 %

T_g z měření DSC: 52 °C, $4,64 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (ekvivalentní 100% míře přežití při sušení)

Stabilitní studie při

skladování koncentrátu B: počty cfu při skladování při teplotě místnosti v nádobách uzavřených pod okolním vzduchem: $4,1 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (88 %) po 28 dnech

Příklad S4

215 ml promytého, tj. v podstatě neobsahujícího laktat sodný, odstředěného fermentu (připraveného podobně jako v příkladu K5) (14,5 % S.C.) se umístí do ledové lázně při teplotě 5 °C. Do chlazeného odstředěného fermentu se za míchání magnetickým míchadlem při frekvenci otáček 700 za minutu vmísí 31,2 g přípravku Glucidex IT6, 4,7 g kyseliny askorbové a 3,1 % glutamatu sodného jako tuhé látky. Hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 %. Směs odstředěného fermentu a

spoluformulujících činidel se dále míchá 30 minut při frekvenci otáček 500 za minutu za použití magnetického míchadla za chlazení v ledové lázni. Tato směs se poté převede sušením rozprašováním, jak je popsáno v příkladu S1, na práškový koncentrát A (vstupní teplota je 105 °C, výstupní teplota je od 54,5 do 55,5 °C).

Práškový koncentrát A se dále suší při teplotě místnosti po dobu 2 hodin v lóži ve vznosu poháněném dusíkem, čímž se získá práškový koncentrát B.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování: 28 % S.C., $8,76 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát B: aktivita vody $a_w = 0,044$

obsah vlhkosti 3,8 %

T_g z měření DSC: 48 °C, $4,17 \cdot 10^{11}$ cfu/g

suché hmoty (ekvivalentní 82% míře

přežití při sušení)

Stabilitní studie při

skladování koncentrátu B: počty cfu při skladování při

teplotě místnosti v nádobách

uzavřených po okolním vzduchem:

$3,7 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (52 %)

po 27 dnech

Příklad S5

K přípravě roztoku spoluformulujícího činidla se 1,40 ml deionizované vody se naplní a v ní se rozpustí 33,3 g

laktózy a 6,3 g peptonu, směs se upraví na celkovou hmotnost 83 g pomocí deionizované vody a hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 %. K přípravě spoluformulujícího roztoku se naplní 2,40 ml deionizované vody a v ní se rozpustí 33,3 g glukóza-1-hydrátu a 5,4 g kyseliny citrónové, směs se upraví na celkovou hmotnost 83 g pomocí deionizované vody a hodnota pH se upraví na 7 za použití vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 40 %. Tyto roztoky 1 a 2 se ochladí na teplotu 5 °C.

200 ml promytého, tj. v podstatě neobsahujícího laktat sodný, odstředěného fermentu (připraveného podobně jako v příkladu K5) (12,7 % S.C.) se smísí s 83 g spoluformulujícího roztoku 1 v ledové lázni při teplotě přibližně 4 °C. Směs se 30 minut míchá při chlazení v ledové lázni. Poté se za míchání přidají 83 g spoluformulujícího roztoku 2 a dále se míchá 30 minut při chlazení v ledové lázni. Tato směs se poté převede sušením rozprašováním, jak je popsáno v příkladu S1, na práškový koncentrát A (vstupní teplota je 105 °C, výstupní teplota je 55 °C).

Práškový koncentrát A se dále suší při teplotě místnosti po dobu 2 hodin v lóži ve vznosu poháněném dusíkem, čímž se získá práškový koncentrát B.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování: 29 % S.C., $7,30 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát B: aktivita vody $a_w = 0,139$

obsah vlhkosti 3,7 %

T_g z měření DSC: 45 °C, $5,06 \cdot 10^{11}$ cfu/g

suché hmoty (ekvivalentní 69% míře

přežití při sušení)

Stabilitní studie při

skladování koncentrátu B: počty cfu při skladování při
teplotě místnosti v nádobách
uzavřených po okolním vzduchem:
 $4,8 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (95 %)
po 21 dni

Příklad S6

Směsi připravené k rozprašování se připraví
způsobem podobným způsobu z příkladu S3. Zde se však použijí
dva různé odstředěné fermenty:

Příklad S6a:

Fermentace ve várce s fermentem, který je 40 minut před
koncem fermentace chlazen na teplotu 4 °C.

Práškový koncentrát A získaný sušením rozprašováním
podle příkladu S1 (vstupní teplota od 107 do 111 °C, výstupní
teplota od 58 do 61 °C) se dále nesuší.

Charakteristiky:

Směs připravená k

rozprašování: $3,68 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: $0,76 \cdot 10^{11}$ cfu/g suché hmoty (ekvi-
valentní 21% míře přežití při sušení)

Příklad S6b

Fermentace ve várci s fermentem, který je před koncem fermentace zahřát na teplotu 44 °C. V tomto příkladu se směs připravená k rozprašování rozdělí. V prvním experimentu se zásobní nádoba udržuje při teplotě 4 °C jako v příkladech S1 až S5 a S6a. V druhém experimentu se zásobní nádoba udržuje při teplotě 20 °C.

Práškové koncentráty A získané sušením rozprašováním podle příkladu S1 (vstupní teplota od 103 do 110 °C, výstupní teplota od 59 do 61 °C) se nedosuší.

Charakteristiky pro zásobní nádobu při teplotě 4 °C:

Směs připravená k

rozprašování: 3,53.10¹¹ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: 2,36.10¹¹ cfu/g suché hmoty (ekvivalentní 67% míře přežití při sušení)

Charakteristiky pro zásobní nádobu při teplotě 20 °C:

Směs připravená k

rozprašování: 3,53.10¹¹ cfu/g suché hmoty

Práškový koncentrát A: 1,48.10¹¹ cfu/g suché hmoty (ekvivalentní 42% míře přežití při sušení)

Příklady formulací

Podle formulí uvedených dále se připraví a zpracují suché směsi práškových koncentrátů podle tohoto vynálezu k vytvoření zhutněných přípravků zalkvasných kultur.

Pokud není upřesněno jinak, použitým uvolňovacím činidlem je leucin a použitým volně tekoucím činidlem je Sipernat 50S (oxid křemičitý sušený rozprašováním).

Jednotlivé složky přípravků se napřed vzájemně smísí. K tomuto účelu se použije například radlicová míchačka (typ Lö 20 od firmy Lödige). Tímto způsobem získaná suchá směs se zhutní v zhutňovači. K tomuto účelu se může použít například laboratorní zhutňovač, který vyvíjí lisovací sílu 14 kN/cm^2 (např. laboratorní zhutňovač L 200 od firmy Bepex). Proužek produktu vystupující ze zhutňovače se poté rozmělní na velikost částic rovnou nebo menší než 1,25 mm. Surové granule se prosejí k oddělení jemného prachu o velikosti částic rovné nebo menší než 0,3 mm. Výtěžek použitelného materiálu je okolo od 50 do 60 % použitého materiálu.

Příklad F1

Příprava zhutněného šumivého produktu pro použití jako zákvasné kultury pro siláž

Přípravek A:

Práškový koncentrát (podle příkladu S2)	200,0 g
Kyselina citrónová, bezvodá	95,0 g
Hydrogenuhličitan sodný	95,0 g
PEG (molekulová hmotnost menší než 400)	8,0 g
Volně tekoucí činidlo	2,0 g

Přípravek B:

Práškový koncentrát (podle příkladu S2)	100,0 g
Kyselina askorbová, prášková	47,5 g

Hydrogenuhličitan sodný	47,5 g
PEG (molekulová hmotnost menší než 400)	4,0 g
Volně tekoucí činidlo	1,0 g

Přípravek C:

Práškový koncentrát (podle příkladu S2)	100,0 g
Kyselina jablečná	47,5 g
Hydrogenuhličitan sodný	47,5 g
PEG (molekulová hmotnost menší než 400)	4,0 g
Volně tekoucí činidlo	1,0 g

Přípravek D:

Práškový koncentrát (podle příkladu S2)	100,0 g
Zeolit A (Wessalith P)	20,0 g
Kyselina askorbová, prášková	37,0 g
Hydrogenuhličitan sodný	36,8 g
Uvolňovací činidlo	3,0 g
Volně tekoucí činidlo	3,0 g

Příklad F2

Příprava rychle rozpustné zhutněné směsi bez šumivé přísady

Práškový koncentrát (podle příkladu S2)	100,0 g
Povrchově aktivní látka rozpustná ve vodě (Pluriol EL 500)	90,0 g
Uvolňovací činidlo	7,0 g
Volně tekoucí činidlo	3,0 g

Příklad F3

Příprava zhutněné směsi

Práškový koncentrát (podle příkladu S5)	100,0 g
Zhutňovací pomocná látka ¹⁾	90,0 g
Uvolňovací činidlo	7,0 g
Volně tekoucí činidlo	3,0 g

¹⁾ zvolena z přípravků Avicel PH 102, Vivapur 105, FlowLac, Maltex 20 a Cellactose nebo jejich směsí

Příklad F4

Příprava stabilizovaných zhutněných směsí

Základní formule:

Práškový koncentrát (podle příkladu S5)	100,0 g
Zhutňovací pomocná látka	50,0 g
Stabilizátor	viz tab.1
Uvolňovací činidlo	7,0 g
Volně tekoucí činidlo	3,0 g

Tab. 1

Stabilizátor	Složka	Množství (g)
A	Zeolit A	40
B	PEG 4000	40
C	Kyselina askorbová ¹⁾	40
D	PEG 4000	20
	Kyselina askorbová	20
E	Zeolit A	20
	Kyselina askorbová	20

Tab. 1 - pokračování

Stabilizátor	Složka	Množství (g)
F	Zeolit A	20
	Kyselina askorbová	3
	PEG 4000	17
G	Zeolit A	10
	Kyselina askorbová	1,5
	PEG 4000	8,5
H	Zeolit A	7
	Kyselina askorbová	1
	PEG 4000	6

¹⁾ v každém případě jde o kyselinu L-askorbovou

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Suchá kultura mikroorganismů obsahující alespoň jeden druh mikroorganismu ve formě vázané na nosič, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že kultura je přítomna ve formě částic, které

a) mají velikost částice alespoň asi 0,1 mm a

b) obsahují od asi 10^8 do 10^{12} cfu/g alespoň jednoho druhu mikroorganismu a

c) jsou zhutněny.

2. Kultura mikroorganismů podle nároku 1, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že částice jsou zhutněny působením lineární síly odpovídající asi 5 až 15 kN/cm nebo tlaku od asi 90 do 160 MPa.

3. Kultura mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2, v y - z n a č u j í c í s e t í m, že zhutněné částice obsahují zhutněný rozmělněný materiál, který má průměr od asi 0,1 mm do asi 2 mm.

4. Kultura mikroorganismů podle nároku 1, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že zhutněné částice obsahují tablety, které mají průměr od asi 2 do 50 mm a poměr průměru k tloušťce od asi 1:0,1 do asi 10:1.

5. Kultura mikroorganismů podle některého z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako další složku šumivou přísadu.

6. Kultura mikroorganismů podle některého z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako nosič alespoň jeden matricový materiál pro uložení buněk mikroorganismů s alespoň jednou další přísadou stabilizující buňky nebo bez ní.

7. Kultura mikroorganismů podle některého z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden druh bakterie tvořící kyselinu mléčnou.

8. Kultura mikroorganismů podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že druh bakterie je zvolen z bakterie rodu *Lactobacillus* sp.

9. Způsob výroby suché kultury mikroorganismů obsahující alespoň jeden druh mikroorganismu ve formě vázané na nosič, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje

a) rozpouštění nebo suspendování alespoň jedné látky vhodné pro tvorbu nosiče v kapalině obsahující alespoň jeden druh mikroorganismu,

b) sušení výsledné směsi v rozprašovacím sušiči, přičemž pro sušení rozprašováním se použije připravený upravený vysušený plyn, který má rosný bod nižší než asi +5 °C, zahřátý na teplotu v rozmezí nad asi 80 °C a

c) odstraňování vysušeného materiálu z rozprašovacího sušiče, přičemž tento vysušený materiál má výstupní teplotu od asi 45 do 75 °C.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že v dalším kroku d) se suchý materiál podrobí dalšímu sušení při teplotě v rozmezí od asi 15 do 50 °C v plynné atmosféře nebo ve vakuu a/nebo se přidá alespoň jedno exsikans.

11. Způsob podle některého z nároků 9 a 10, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se jako suchý materiál získá práškový koncentrát, který má obsah životaschopných mikroorganismů od asi $5 \cdot 10^8$ do $1 \cdot 10^{12}$ cfu/g.

12. Suchá zhutněná kultura mikroorganismů podle některého z nároků 1 až 8, připravitelná z práškového koncentráту kultury mikroorganismů vysušeného způsobem podle některého z nároků 9 až 11.

13. Způsob přípravy suché kultury mikroorganismů podle některého z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

- i) výrobu práškového koncentráту kultury mikroorganismů sušením rozprašováním na nosiči, lyofilizací na nosiči nebo sušení v lóži ve vzosu na nosiči,
- ii) se smísením práškového koncentráту s jedním nebo více spoluformulujícími činidly nebo bez toho a
- iii) zhutnění nebo tabletování této směsi.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zhutněný práškový koncentrát z kroku iii) se rozmělní s tříděním nebo bez něho.

15. Způsob přípravy suché hrudkované kultury mikroorganismů,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

- i) přípravu práškového koncentráту kultury mikroorganismů sušením rozprašováním na nosiči, lyofilizací na nosiči nebo sušení v lóži ve vznosu na nosiči,
- ii) se smísením práškového koncentrátu s jedním nebo více spoluformulujícími činidly nebo bez toho a
- iii) hrudkování této směsi.

16. Způsob podle nároku 13 nebo 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sušení rozprašováním se provádí podle některého z nároků 9 až 12.

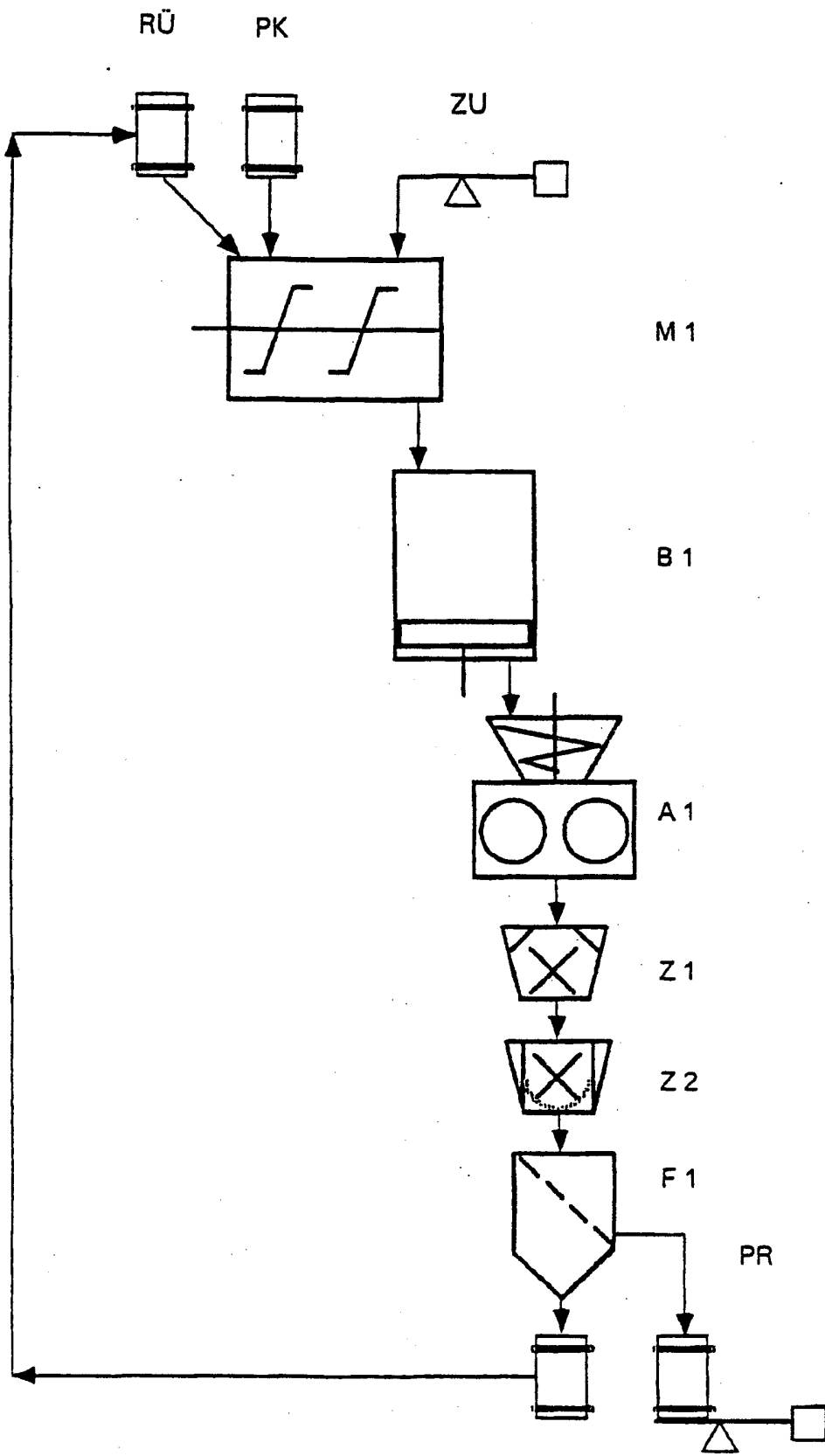
17. Použití kultury mikroorganismů podle některého z nároků 1 až 8 nebo připravené způsobem podle některého z nároků 9 až 16 jako zákvasné kultury pro potraviny a krmiva.

18. Potravina nebo krmivo připravené za použití kultury mikroorganismů podle některého z nároků 1 až 8 nebo připravené podle některého z nároků 9 až 16 jako zákvasná kultura.

10101

PV 2070-4011

~~2900~~



Obr. 1