

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 66937 B1



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ  
ЗА  
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(51) Int.Cl.

A 23 C 9/00 (2006.01)

A 23 C 9/12 (2006.01)

A 23 C 9/123 (2006.01)

A 23 C 9/127 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 111161

(22) Заявено на 07.03.2012

(24) Начало на действие  
на патента от: 07.03.2012

## Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 9 на 30.09.2013

(45) Отпечатване на 15.08.2019

(46) Публикувано в бюлетин № 8.1  
на 15.08.2019

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №:

(73) Патентоприетжател(и):

"ДАФЛОРН" ООД, 9300 ДОБРИЧ,  
УЛ. "ЙОРДАН ЙОВКОВ" 8

(72) Изобретател(и):

Даниела Петрова Пенева  
Никола Георгиев Александров(74) Представител по индустриална  
собственост:Д-р Станислава Христова Стефанова,  
1799 София, жк "Младост 2" бл. 223,  
вх. 4, ап. 59

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) АСОЦИАЦИЯ ОТ ПРОБИОТИЧНИ МЛЕЧНОКИСЕЛИ МИКРООРГАНИЗМИ ЗА ПОЛУ-  
ЧАВАНЕ НА ДИЕТИЧНИ МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ

(57) Изобретението се отнася до асоциация от пробиотични млечнокисели микроорганизми за получаване на диетични млечни продукти, по-специално до асоциация от щамове на пробиотични млечнокисели микроорганизми, изолирана такава каквато е, от природен водоизточник в Северна България - изворна вода от извор в Стара планина, регион Централен, включваща:

щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DWT1, регистриран в ССМ с № 7992

щам *Lactobacillus helveticus* DWT2, регистриран в ССМ с № 7993

щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DWT3, регистриран в ССМ с № 7994

щам *Streptococcus thermophilus* DWT4, регистриран в ССМ с № 7992

щам *Streptococcus thermophilus* DWT5, регистриран в ССМ с № 7993

щам *Streptococcus thermophilus* DWT6, регистриран в ССМ с № 7994

щам *Streptococcus thermophilus* DWT7, регистриран в ССМ с № 7995 и

щам *Streptococcus thermophilus* DWT8, регистриран в ССМ с № 7996.

Друг аспект на настоящото изобретение се отнася до метод за получаване на диетичен млечен продукт за здравословно хранене на хората с участието на пробиотичната асоциация от щамове на млечнокисели микроорганизми, изолирани от изворна вода, до диетичен млечен продукт с доказана антимикробна активност, който след лиофилизация и при съхранение на стайна температура от 18°C до 24°C в продължение на повече от 22 месеца съдържа концентрация на живи клетки от асоциацията пробиотични млечнокисели микроорганизми в границите от  $8,0 \times 10^7$  cfu/g до  $1,2 \times 10^8$  cfu/g, а след

BG 66937 B1

рехидратация и при експериментални екстремални условия на стомашно-чревния тракт съдържа концентрация на живи клетки от пробиотичната асоциация не по-малко от  $1,1 \times 10^7$  cfu/g. Изобретението се отнася още и до хранителна добавка за здравословно хранене на хора, включваща диетичният млечен продукт, получен с участието на асоциацията от пробиотични микроорганизми, изолирана такава каквато е, от природен водоизточник в Северна България - изворна вода от извор в Стара планина, в комбинация с инстантно кафе и/или какао и/или сух екстракт на черна боровинка и/или сух екстракт на папая и/или масла и/или сухи добавки, избрани от групата, включваща растителни екстракти, фибри, ензими и мед.

**6 претенции, 13 фигури**

---

**(54) АСОЦИАЦИЯ ОТ ПРОБИОТИЧНИ МЛЕЧНОКИСЕЛИ МИКРООРГАНИЗМИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ДИЕТИЧНИ МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ****Област на изобретението**

Изобретението се отнася до асоциация от пробиотични млечнокисели микроорганизми за получаване на диетични млечни продукти за здравословно хранене на хората.

**Предшестващо състояние**

Известно е, че продукти, получени чрез млечнокиселата ферментация се произвеждат от хората от векове. Те са здравословна храна, която голяма част от хората приемат ежедневно още от ранна детска възраст.

За получаването на тези храни се използват както самостоятелно, така и в комбинация различни щамове млечнокисели микроорганизми, в това число *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* и други, проявяващи доказани пробиотични свойства.

Известно е също, че *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* е специфичен вид микроорганизъм, различаващ се съществено от другите пробиотични бактерии. Счита се, че тази бактерия е с растителен произход, която в естествени условия се развива само в определена географска територия, съвпадаща с територията на България и отговаряща до голяма степен на територията на древна Тракия /1/. Извън тази географска територия микроорганизмът мутира и не се развива. Известно е също, че *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* може да се кооперира само със *Streptococcus thermophilus* при млечнокиселата ферментация и в организма на хората и животните. При тази уникална кооперация те взаимно се подпомагат един друг, което довежда до многократно засилване на полезните и до балансиране на страничните им ефекти. Тези благоприятни ефекти включват позитивен ефект върху естествената микрофлора на човека, конкурентно изключване на патогени и стимулиране/модуляция на мукозния имунитет и познанията за това са използвани в редица разработки за получаване на пробиотични продукти (заявки за патент EP 2281870 A1 и РСТ/BG 2010/000021, BG 106827, патенти BG 63961, BG 65652 и др.).

Основавайки се на знанието, че *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* може да се кооперира със *Streptococcus thermophilus* при млечнокиселата ферментация и в организма на хората и животните, към настоящия момент като основен източник за търсене на нови щамове пробиотични млечнокисели микроорганизми се използват традиционните млечнокисели продукти или изолати от човешки и/или животински и/или растителен произход.

За *Lactobacillus helveticus* и *Streptococcus thermophilus* също е известно, че се изолират от растения, мляко и млечни продукти. Известно е също, че *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* е подвид на *Lactobacillus delbrueckii*, като за него е установена 86% хомоложност с тази на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* /2/.

**Същност на изобретението**

Настоящото изобретение се отнася до асоциация от пробиотични млечнокисели микроорганизми, по-специално до асоциация от щамове на пробиотични млечнокисели микроорганизми, изолирана такава каквато е, от природен водоизточник в Северна България - изворна вода от извор в Стара планина, регион Централен. Тази асоциация включва оригинални щамове на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* и *Streptococcus thermophilus*. По-специално, щамове, изолирани от изворна вода, съгласно изобретението са:

- щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DWT1, регистриран в ССМ с № 7992
- щам *Lactobacillus helveticus* DWT2, регистриран в ССМ с № 7993
- щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DWT3, регистриран в ССМ с № 7994
- щам *Streptococcus thermophilus* DWT4 регистриран в ССМ с № 7992
- щам *Streptococcus thermophilus* DWT5 регистриран в ССМ с № 7993
- щам *Streptococcus thermophilus* DWT6 регистриран в ССМ с № 7994
- щам *Streptococcus thermophilus* DWT7 регистриран в ССМ с № 7995 и

щам *Streptococcus thermophilus* DWT8 регистриран в ССМ с № 7996

Друг аспект на настоящото изобретение се отнася до метод за получаване на диетични млечни продукти за здравословно хранене на хората, с участието на пробиотичната асоциация от щамове на млечнокисели микроорганизми, изолирани от изворна вода, съгласно изобретението.

Още един аспект на настоящото изобретение се отнася до диетичен млечен продукт, който след лиофилизация съдържа живи клетки от пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, в концентрация от  $8,0 \times 10^7$  cfu/g до  $1,2 \times 10^8$  cfu/g, по-специално концентрация на живи клетки от щамовете *Streptococcus thermophilus* от  $4,6 \times 10^7$  cfu/g до  $5,9 \times 10^7$  cfu/g, в това число щам *Streptococcus thermophilus* DWT4 регистриран в ССМ с № 7992, щам *Streptococcus thermophilus* DWT5 регистриран в ССМ с № 7993, щам *Streptococcus thermophilus* DWT6 регистриран в ССМ с № 7994, щам *Streptococcus thermophilus* DWT7 регистриран в ССМ с № 7995 и щам *Streptococcus thermophilus* DWT8 регистриран в ССМ с № 7996, а така също и концентрация на живи клетки от щам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, регистриран в ССМ с № 7994 от  $6,1 \times 10^6$  cfu/g до  $7,8 \times 10^6$  cfu/g, концентрация на живи клетки от щам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, регистриран в ССМ с № 7992 от  $1,4 \times 10^7$  cfu/g до  $2,9 \times 10^7$  cfu/g и концентрация на живи клетки от щам *Lactobacillus helveticus* регистриран в ССМ с № 7993 от  $1,4 \times 10^7$  до  $2,8 \times 10^7$  cfu/g.

Освен това, друг аспект на настоящото изобретение се отнася до хранителна добавка за здравословно хранене на хората с участието на асоциацията от пробиотични щамове на млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението.

### Определения

1. Пробиотик - Живи микроорганизми, които при приемане в подходящи количества като част от храната, влияят благоприятно върху здравето на консуматора /10/.

2. Пробиотици - Пробиотиците (*Lactobacillus*) са функционални съставки, съдържащи се в киселото мляко и други млечни продукти и подобряващи здравословното състояние на гастроинтестиналния тракт /3/.

3. Препоръчително количество живи микроорганизми в пробиотичен продукт - най-малко  $10^7$  живи микроорганизми за грам или за милилитър /4/.

4. Минимална необходима концентрация на живи клетки на грам продукт - количество от  $10^6$  до  $10^9$  към момента на консумация с оглед получаване на благоприятен резултат /5/.

### Кратко описание на фигурите

Фигура 1 представя макрорестрикционните профили на изолати на *Streptococcus thermophilus*, съдържащи се в проба от пробиотичната асоциация, съгласно изобретението;

Фигура 2 представя макрорестрикционните профили на изолатите *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lb. delbrueckii* ssp. *Lactis*;

Фигура 3 представя рестрикционен фрагмент за изолат на *Streptococcus thermophilus*, съответстващ на щам *Streptococcus thermophilus* DWT5 регистриран в ССМ с № 7993;

Фигура 4 представя рестрикционен фрагмент за изолат на *Streptococcus thermophilus*, съответстващ на щам *Streptococcus thermophilus* DWT4 регистриран в ССМ с № 7992;

Фигура 5 представя рестрикционен фрагмент за изолат на *Streptococcus thermophilus*, съответстващ на щам *Streptococcus thermophilus* DWT6 регистриран в ССМ с № 7994;

Фигура 6 представя рестрикционен фрагмент за изолат на *Streptococcus thermophilus*, съответстващ на щам *Streptococcus thermophilus* DWT8 регистриран в ССМ с № 7996;

Фигура 7 представя рестрикционен фрагмент за изолат на *Streptococcus thermophilus*, съответстващ на щам *Streptococcus thermophilus* DWT7 регистриран в ССМ с № 7995;

Фигура 8 - макрорестрикционен профил на геномна ДНК на изолат *Lactobacillus helveticus*, съответстващ на щам *Lactobacillus helveticus* DWT2, регистриран в ССМ с № 7993;

Фигура 9 - макрорестрикционен профил на геномна ДНК на изолат от *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, съответстващ на щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DWT1, регистриран в ССМ с № 7992;

Фигура 10 - макрорестрикционен профил на геномна ДНК на изолат от *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

*lactis*, съответстващ на щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DWT3, регистриран в ССМ с № 7994;

Фигура 11 - генетичен профил на изолати от *Streptococcus thermophilus* от проби в близост до водоизточника (мъха от дървото и от тревата до водата);

Фигура 12 - генетичен профил на изолати от *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* от проби в близост до водоизточника (от тревата до водата и от водораслите вътре във водата);

Фигура 13 - генетичен профил на изолати от *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* от проби в близост до водоизточника (от тревата до водата и от водораслите вътре във водата) сравнени с генетичен профил на изолат от изворната вода.

#### Подробно описание на изобретението

Образци от щамове микроорганизми, съдържащи се в пробиотичната асоциация млечнокисели микроорганизми, изолирана такава каквата е, от природен водоизточник в Северна България - изворна вода от извор в Стара планина, регион Централен, съгласно изобретението, са депозиран на 20.02.2012 в Чешката колекция за микроорганизми (ССМ) при условията на Будапещенския договор за международно признаване депозирането на микроорганизмите във връзка с процедурата по патентоване. Съответно, всеки от тях има регистрационен номер както следва:

Щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DWT1, регистриран в ССМ с № 7992;

Щам *Lactobacillus helveticus* DWT2, регистриран в ССМ с № 7993;

Щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DWT3, регистриран в ССМ с № 7994;

Щам *Streptococcus thermophilus* DWT4 регистриран в ССМ с № 7992;

Щам *Streptococcus thermophilus* DWT5 регистриран в ССМ с № 7993;

Щам *Streptococcus thermophilus* DWT6 регистриран в ССМ с № 7994;

Щам *Streptococcus thermophilus* DWT7 регистриран в ССМ с № 7995 и

Щам *Streptococcus thermophilus* DWT8 регистриран в ССМ с № 7996

Както е показано в Пример 1 по-долу, видовата принадлежност на пръчките е установена посредством метода ARDRA (рестрикционен анализ на амплифицирана рибозомална ДНК) по Giraffa et al. /6/. Видовата принадлежност на коковите форми е установена с видово/родово специфичен PCR по Lick et al. /7/, Nomura et al. /8/ и Ke et al. /9/. Като референтни култури са използвани *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus helveticus* DSM20075, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20072, *Streptococcus thermophilus* DSM 20617; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DSM 20481 и *Enterococcus faecalis* LMG 2937.

Резултатите от броя на прорасналите колонии на среди M17 и MRS показват, че всички изолати коки принадлежат към вида *Streptococcus thermophilus* и достигат количество от  $4,6 \times 10^7$  cfu/g до  $5,9 \times 10^7$  cfu/g, докато пръчките достигат до количество от  $3,5 \times 10^7$  cfu/g до  $6,5 \times 10^7$  cfu/g и се разделят по видова принадлежност на *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *L. delbrueckii* ssp. *lactis*.

Видовият състав и числеността на отделните групи микроорганизми, съдържащи се в пробиотичната асоциация съгласно изобретението, са представени на Таблица 1 по-долу.

Таблица 1

Общо количество микроорганизми от асоциацията (cfu/g)	$0,0 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$		
<i>Str. thermophilus</i>	$4,8 \times 10^7 - 6,9 \times 10^7$		
<i>Lactobacillus</i> sp.	$3,5 \times 10^7 - 6,5 \times 10^7$		
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	$6,1 \times 10^6 - 7,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 - 2,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7 - 2,8 \times 10^7$

Разграничаването на отделните щамове микроорганизми в проби от пробиотичната асоциация, както е показано в Пример 1 от настоящето изобретение, е извършено с макрорестрикционен анализ с Пулсова електрофореза на апарат CHEF-DR II BioRad. За рестрикционен анализ на геномна ДНК са използвани ензимите SmaI и XhoI съответно за коките и пръчките.

Резултатите, показващи макрорестрикционните профили на седем изолата на *Streptococcus thermophilus* са представени на Фигура 1 и показват общо пет генетични профила, съответстващи на най-малко пет щамове *Streptococcus thermophilus*, като две двойки изолати показват еднакви профили, а останалите три изолата имат самостоятелни профили. Размерът на получените рестрикционни фрагменти за изолатите на *Streptococcus thermophilus* са представени на Фигури 3-7.

За същата проба е определен и генетичният профил на два изолата *Lactobacillus helveticus*, два изолата *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и два изолата *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. Получени са общо три профила, съответстващи на всяка двойка изолати от един от трите вида лактобацили. Макрорестрикционните профили на изолатите лактобацили са представени на Фигура 2, а размерът на получените рестрикционни фрагменти е представен на Фигури 8-10.

За доказване отсъствието на контаминация от източници в близост до изворите, паралелно с експериментите за доказване на видова принадлежност, численост и щамово разнообразие в пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, са направени изследвания на микробиалния състав на проби, получени от мъха от дървото до извора (проба П1), от тревата до водата (проба П2) и от водораслите вътре във водата (Проба П3), показващи категорично, че щамовото разнообразие е различно от това в изворната вода. По-специално, както подробно е описано в Пример 2 по-долу, установена е наличност на щамове от вида *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus lactis*, които са различни от тези, намиращи се в асоциацията, изолирана от изворна вода, а щамове, принадлежащи към вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus* не са установени в нито една от изследваните проби.

Установеното при паралелните изследвания безспорно доказва, че щамовете от пробиотичната асоциация млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението, могат да живеят и в изворна вода, поставяйки на дневен ред въпроса за ревизия на общоприетото схващане, че видовете млечнокисели бактерии, към които принадлежат тези щамове, могат да бъдат изолирани само от млечни продукти и растения.

Друг важен аспект от настоящото изобретение е метод за получаване на диетични млечни продукти за здравословно хранене, включващ операциите заквасване на мляко със стартерна култура от асоциацията от пробиотични щамове на млечнокисели микроорганизми, изолирани от изворна вода, съгласно изобретението, ферментация и лиофилизация.

За получаване на стартерна култура от пробиотичната асоциация от щамове на млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението, най-напред се пристъпва към улавяне и намножаване на микроорганизмите, съдържащи се във водата от извор в Стара планина, с оглед получаване на биомаса. За целта, стандартизирано и пастьоризирано мляко се заквасва с изворна вода в съотношение 2:1. Сместа се поставя в затворен стъклен стерилен съд и се третира на водна баня при температура от 42°C до 45°C за 38 до 40 h. В края на този период на повърхността на сместа се отделя бяла на цвят биомаса с мека консистенция.

Непосредствено след това, към предварително приготвен 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено или обезмаслено мляко стерилизирано при 121°C за 15 min и охладено до температура 45°C, се прибавя биомаса в съотношение съответно 10:0,3 и сместа се оставя да ферментира в продължение на 12 h при температура от 43°C до 45°C. Полученият продукт представлява течна закваска от изворна вода. Следва повторно приготвяне на 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено или обезмаслено мляко, стерилизация на млякото при 121°C за 15 min и охлаждане до 45°C, след което сместа се неутрализира с 10%-ен разтвор на натриева основа до достигане на оптимално рН 4.6 до 4.7. Към този разтвор се прибавя течна закваска в съотношение разтвор на мляко:течна закваска 60:1. Следва ферментация в продължение на 10 до 12 h при температура 43°C до 45°C, след което се добавя предварително приготвен криопротектор, представляващ 15%-ен воден разтвор на захар в съотношение ферментирал млечен разтвор към криопротектор 30:1, сместа се разбърква и се

подлага на лиофилизация в продължение на 48 h. Така получената суха стартерна култура се използва за получаване на диетични млечни продукти.

Методът за получаването на диетични млечни продукти с помощта на стартерната култура от шамовите млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението, включва предварително приготвяне на 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено или обезмаслено мляко, което след това се подлага на стерилизация при 95°C-96°C за 30 min с последващо охлаждане до 45°C и неутрализация с 10%-ен разтвор на натриева основа до достигане на рН 6,6- 6,7. Следва приготвяне на воден захарен разтвор в съотношение 1:1, който се загрява до кипване. Така приготвения воден захарен разтвор се прибавя към водния разтвор на млякото в съотношение 10:1 и към така получената смес се добавя сухата стартерна култура, съгласно изобретението, в съотношение млечна смес:стартерна култура 5:0,003. Следва ферментация в продължение на 12 h при 43°C до 45°C и така полученият продукт се подлага на лиофилизация в продължение на 48 h.

Методът за получаване на диетични продукти, съгласно изобретението, както е описан в детайли в Пример 3 по-долу, позволява на микроорганизмите, съдържащи се в изворната вода, след това в биомасата и в стартерната култура, да се размножават заедно, което води до получаване на изключително богати на живи микроорганизми продукти, с което си качество са особено ценни за здравословното хранене на човека.

Изследванията за преживяемост на микроорганизмите от асоциацията, съгласно изобретението, проведени с оглед количеството на живи клетки пробиотични бактерии в течна и суха проба съответно преди и след лиофилизация на продуктите, описани в детайли в Пример 4 по-долу показват, че технологичния процес на замразяване и лиофилизационно сушене е протекъл успешно и лактобацилите и коките са запазени живи в количества, отговарящи на изискванията за пробиотичен продукт. Преживяемостта на микроорганизмите от асоциацията при съхранение на стайна температура (20°C - 24°C), е доказана и подробно описана в Пример 5 по-долу, а така също и след рехидратация при екстремални експериментални условия на преминаване през гастроинтестиналния тракт, описана и доказана в детайли в Пример 6 по-долу. Получените по метода, съгласно изобретението, продукти са с доказан здравословен ефект, подробно описан и доказан в Пример 7 по-долу.

Още един аспект на изобретението е да се предложат хранителни добавки за здравословно хранене на хора на основата на асоциацията от пробиотични шамове млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението. Тези хранителни добавки включват диетичният продукт, получен по метода, съгласно изобретението, в комбинация с инстантно кафе и/или какао и/или сух екстракт на черна боровинка и/или сух екстракт на папая и/или масла и/или сухи добавки, избрани от групата, включваща растителни екстракти, фибри, ензими и мед.

Изобретението се илюстрира със следните примерни изпълнения, без да ограничават неговия обхват.

Пример 1. Характеристика на пробиотичната асоциация

Всички анализи по отношение на видовия и шамов състав на симбиотичната асоциация пробиотични микроорганизми, резултатите от които са изложени по-долу, са извършени в Лаборатория „ДНК-анализ“ на ЕЛБИ Булгарикум ЕАД, София, България. Изпитванията са проведени за две проби, условно обозначени като ИН1 и ИС1.

Установяване на видовия състав

Видовата принадлежност на съдържащите се пръчки в пробиотичната асоциация микроорганизми, изолирана от изворна вода от извор в Стара планина, е установена посредством метода ARDRA (рестрикционен анализ на амплифицирана рибозомална ДНК) по Giraffa et al. /6/. Видовата принадлежност на коковите форми в същата пробиотична асоциация е установена с видово/родово специфичен PCR по Lick et al. /7/, Nomura et al. /8/ и Ke et al. /9/. Като референтни култури са използвани *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus helveticus* DSM20075, *L. delbrueckii ssp. lactis* DSM 20072, *Streptococcus thermophilus* DSM 20617; *Lactococcus lactis ssp. lactis* DSM 20481 и *Enterococcus faecalis* LMG 2937.

Установяване на шамовия състав на пробите

Разграничаването на отделните шамове сред изолатите от пробите е осъществено с макрорестрик-

ционен анализ с Пулсова електрофореза на апарат CHEF-DR II BioRad. За рестрикционен анализ на геномна ДНК са използвани ензимите SmaI и XhoI съответно за коките и пръчките.

Количествени стойности на коки и пръчки в Проба ИН1: Оценката за броя на коките и на пръчките за проба ИН1, взета от изворна вода през Април 2011, е направена на база брой прораснали колонии от проба ИН1 на среди M17 и MRS; броят на коките и пръчките е оценен съответно на  $4,6 \times 10^7$  cfu/g и  $3,5 \times 10^7$  cfu/g. Всички изолати коки са отнесени към вида *Streptococcus thermophilus*, докато пръчките са разделени по видова принадлежност на *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*.

Щамов състав на проба ИН1: От проба ИН1 е определен генетичния профил на седем изолата *Streptococcus thermophilus*, означени служебно като i21, i22, i24, i26, i31, i32 и i34. Установени са общо пет генетични профила, съответстващи на най-малко пет щама *Str. thermophilus* в тази проба. Еднакви профили са получени за двойките (i21 и i24) и (i32 и i34), изолатите i22, i26 и i31 имат самостоятелни профили. Макрорестрикционните профили на тези изолати са представени на Фигура 1, а размера на получените рестрикционни фрагменти е представен на Фигури 3-7.

За същата проба е определен и генетичният профил на изолати, служебно означени като *Lactobacillus helveticus* i1m и i5m, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i2m и i4s и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* i3L и i7L. Получени са общо три профила, съответстващи на всяка двойка изолати от един от трите вида лактобацили. Макрорестрикционните профили на изолатите лактобацили от проба ИН1 са представени на Фигура 2, а размера на получените рестриктни фрагменти е детайлно описан на Фигури 8-10.

Количествени стойности на коки и пръчки в Проба ИС1: За потвърждаване на микробиалния състав на Проба ИС1, взета от изворна вода през март 2010, оценката за броя на коките и на пръчките е направена на база брой прораснали колонии от проба ИС1 на среди M17 и MRS, както за проба ИН1 по-горе; броят на коките и на пръчките са оценени съответно на  $4,9 \times 10^7$  cfu/g и  $5,6 \times 10^7$  cfu/g. Всички изолати коки са отнесени към вида *Streptococcus thermophilus*, докато пръчките са разделени по видова принадлежност на *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *L. delbrueckii* ssp. *lactis*.

Щамов състав на проба ИС1: От проба ИС1 е определен генетичния профил на шест изолата *Streptococcus thermophilus*. Установени са общо пет генетични профила, съответстващи на пет щама *Str. thermophilus*, които са идентични с генетичните профили на изолатите i21, i22, i26, i31 и i32 на *Str. thermophilus* в проба ИН1. За проба ИС1 е определен и генетичният профил на шест изолата *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*. Получени са общо три генетични профила, идентични с генетичните профили на изолатите i1m на *Lactobacillus helveticus*, i2m на *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* и i3L на *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* в пробата ИН1.

Идентичните резултати по отношение състава на пробиотичната асоциация, получени при изследване на двете различни проби, взети в интервал от една година от един и същ природен водоизточник - извор в Стара планина, показват недвусмислено, че конкретните щамове пробиотични микроорганизми могат да живеят самостоятелно в изворната вода и да се размножават заедно.

Пример 2. Доказване на водния произход на асоциацията

За доказване отсъствието на контаминация от източници в близост до изворите, са направени паралелни изследвания на микробиалния състав на проби, изолирани от мъха от дървото на 4 m от извора (Проба П1), от тревата непосредствено до извора (проба П2) и от водораслите вътре в извора (Проба П3) през Септември 2011.

Методите за установяване броя на млечнокиселите бактерии, видовият и щамов състав на пробите са идентични с методите, използвани при анализ на проба ИН1 както в Пример 1.

Видов състав на пробите П1, П2 и П3

Видовият състав на отделните проби и числеността на отделните групи микроорганизми е представен в Таблица 2. От групата на коките в пробите е установено присъствието на *Enterococcus* sp. и *Streptococcus thermophilus*, а от лактобацилите - единствено на *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*. В пробите не е установено присъствие на *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus*.

Таблица 2. Видов състав и численост на микроорганизмите (cfu/g) в анализираните проби

Проба	<i>Streptococcus</i> ср.	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Други, различни от млечнокисели бактерии	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
П1	$7,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	-	-	-	-
П2	$1,9 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	-	-
П3	$6,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	-	-

#### Щамов състав на пробите

##### Щамове *Streptococcus thermophilus*

В проба П1 е установено присъствието на най-малко два щама *Str. thermophilus* според генетичният им профил, представени от изолати Пк1/1 и Пк1/2 (Пк1/3 е идентичен с Пк1/1) (Фигура 11, пътеки 7-9). Два щама *S. thermophilus* са определени и за проба П2, представени от изолати Пк2/1 и Пк2/2 (Фигура 11, пътеки 5 и 6). В проба П3 са анализирани четири изолатата *Str. thermophilus*, всички показващи профил, идентичен с промишления щам LBB.TN1 (щамът е собственост на „ЕЛБИ Булгарикум“ ЕАД и профилът не е представен). Проби П1 и П2 споделят щам *Str. thermophilus* с общ профил, представен съответно от изолати Пк1/2 и Пк2/1 (Фигура 11, пътеки 8 и 5). Сравнени с профили на изолати от *Str. thermophilus* от проба ИН1, както е показано по-горе в Пример 1, изолатите от проби П1, П2 и П3 са различни и не съвпадат с по-рано изолираните.

##### Щамове *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*

В проби П2 и П3 е установено присъствието на най-малко два щама *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, които са общи и за двете проби. Единият профил е ясно разграничим и включва изолати Пп3/1, Пп3/3, Пп3/5, Пп2/2, Пп2/4 и Пп2/5 (Фигура 12). Профилът на втория щам *L. delbrueckii* ssp. *lactis* е по-добре охарактеризиран при втори анализ, който показва идентичността на изолати Пп3/6 и Пп2/3 (Фигура 13, пътеки 1 и 2). Нито един от двата профила на щамове *L. delbrueckii* ssp. *lactis* не съвпада с профила на *L. delbrueckii* ssp. *lactis* i3L от проба ИН1, както е показано в Пример 1 (Фигура 13, пътека 5), което показва, че съдържащите се в проби П2 и П3 щамове са различни от щам, изолиран от изворната вода.

Резултатите от изследванията на микроорганизмите, установени в мъха от дървото, тревата около извора и водораслите вътре в извора са различни от тези, установени в изворната вода и представляват още едно доказателство, че пробиотичната асоциация микроорганизми, изолирана от природен водоизточник, съгласно изобретението, не е резултат от контаминация.

#### Пример 3. Получаване на диетичен млечен продукт, съдържащ пробиотичната асоциация

За получаване на диетичен млечен продукт със стартерна култура, съдържаща пробиотичната асоциация, описана в детайли в Примери 1 и 2 по-горе, най-напред микроорганизмите, изолирани от изворна вода се улавят и размножават с оглед получаване на биомаса. За целта, 1,0 l стандартизирано и пастеризирано краве мляко с масленост 3.6% се заквасва с 0.5 l вода, взета непосредствено от извора. Съдът с мляко и изворна вода се поставя на водна баня при температура 43°C за период от 40 h, в края на който на повърхността на сместа се отделя бяла на цвят биомаса с мека консистенция.

От така получената биомаса след това се пристъпва към получаване на стартерна култура, като за целта 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено краве мляко се подлага на стерилизация при 121°C за 15 min и се охлажда до 45°C и към 10,0 l от него се добавят 3,0 g от получената както по-горе биомаса. Сместа ферментира в продължение на 12 h при температура 43°C за получаване на течна закваска. Следва приготвяне на нов 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено краве мляко, който се подлага на стерилизация при 121°C за 15 min с последващо охлаждане до 45°C и

към 6,0 l от този разтвор се прибавя 0,1 l от течната закваска с изворна вода. Сместа се неутрализира с 10%-ен разтвор на натриева основа до достигане на оптимално рН от 4.6 до 4.7 и полученият ферментационен продукт се подлага на лиофилизация в продължение на 48 h. Този сух продукт представлява стартерната култура за получаване на диетични млечни продукти.

За получаване на сух диетичен млечен продукт, 10%-ен воден разтвор на сухо стандартизирано пълномаслено или обезмаслено краве мляко се подлага на стерилизация 95°C-96°C за 30 min, след което се охлажда до 45°C и се неутрализира с 10%-ен разтвор на натриева основа до достигане на рН 6,6-6,7. Следва приготвяне на воден захарен разтвор в съотношение 1:1, който се загрява до кипване, оставя се да се охлади и се прибавя към водния разтвор на млякото в съотношение мляко: захарен разтвор 10:1.

Към 5,0 l от така получената смес се добавят 3,0 g суха стартерна култура, получена както в Пример 3 по-горе. Следва ферментация за 12 h при 43°C-45°C и полученият продукт се подлага на лиофилизация за 48 h. Последната включва замразяване при температура -41°C и сублимация до достигане на температура 31°C. Така получените продукти се съхраняват при стайна температура.

Пример 4. Преживяемост след лиофилизация

Изследването на преживяемостта на пробиотичната асоциация от шамовете млечнокисели микроорганизми след лиофилизация, е проведено в Лаборатория „ДНК Анализ” на ЕЛБИ Булгарикум ЕАД, при което са използвани същите методи за определяне на видовия състав и числеността на микроорганизмите в пробите, както в Пример 1.

Преживяемостта при лиофилизация е показана чрез изследване на броя на млечнокиселите бактерии и видовия състав в течна проба (ТИ) и суха проба (ВИ). Проба ТИ представлява ферментационния продукт за получаване на пробиотични продукти, непосредствено преди тяхната лиофилизация. Пробата е произведена през октомври 2011 година от суха стартерна култура, получена от изворна вода, взета през Април 2011 година. От своя страна, проба ВИ е получена непосредствено след лиофилизация на проба ТИ.

Състав на пробите

Данните за видовия състав и числеността на отделните групи микроорганизми във всяка от пробите са обобщени на Таблица 3 по-долу. От групата на коките в пробите са установени *Streptococcus thermophilus*, а от лактобацилите - *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus*.

Таблица 3

Проба	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
ТИ – течна (cfu/ml)	$9,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
ВИ – суха (cfu/g)	$4,6 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$

Както е видно от Таблица 3, числеността на лактобацилите в течната проба е значителна с превес на *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, който в млечна среда може да достигне и леко надмине численост от  $10^9$  cfu/ml. Числеността на *Streptococcus thermophilus* е близка до  $10^8$  cfu/ml, което е обичайна стойност за млечна среда, но е по-ниска от обичайно постиганите при култивиране при контролирано рН (над  $10^9$  cfu/ml). В сухата проба съдържанието на пръчки и коки е леко намалено, но е запазено достатъчно високо. Имайки предвид високата чувствителност на тези видове лактобацили към лиофилизация, резултатите от изследванията недвусмислено доказват, че технологичния процес на замразяване и лиофилизационно сушене е протекъл успешно и лактобацилите и коките са запазени живи в количества, отговарящи на изискванията за пробиотичен продукт.

Пример 5. Преживяемост във времето при съхранение на стайна температура (20°-24°C)

За доказване преживяемостта на микроорганизмите във времето са изследвани броят и видовия

състав на млечнокиселите бактерии в проби ИН1, ИВ1 и ИС1 от сухи диетични продукти, получени по метода, съгласно изобретението. Проба ИН1 е произведена през Май 2011 година от суха стартерна култура, получена от изворната вода взета през Април 2011 година; Проба ИВ1 е произведена през Ноември 2011 година от суха стартерна култура, получена от изворната вода взета през Април 2011 година и Проба ИС1 е произведена през Март 2010 година от суха стартерна култура, получена от изворната вода взета през Март 2010 година. Всички проби след производството им са съхранявани при стайна температура 18°C-24°C.

Видов състав на проби ИН1, ИВ1 и ИС1

И при трите проби преценката за численост е направена по броя на прорасналите колонии след посявка на десетократни разреждания от сух препарат върху среди М17 и MRS. Броят на коките и на пръчките е оценен както следва:

Проба ИН1 -  $4,6 \times 10^7$  cfu/g коки и  $3,5 \times 10^7$  cfu/g пръчки.

Проба ИВ1 -  $5,9 \times 10^7$  cfu/g коки и  $6,5 \times 10^7$  cfu/g пръчки.

Проба ИС1 -  $4,9 \times 10^7$  cfu/g коки и  $5,6 \times 10^7$  cfu/g пръчки.

Всички изолати коки са отнесени към вида *Streptococcus thermophilus*, докато пръчките са разделени по видова принадлежност на *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis*.

Видовият състав на пробите и числеността на отделните групи микроорганизми в тях (cfu/g), както и съотношението на отделните бактериални видове в пробите е представен в Таблица 4 по-долу.

Таблица 4

Проба	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Общ брой млечнокисели микроорганизми
ИН1	$4,6 \times 10^7$	$6,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$8 \times 10^7$
ИВ1	$5,9 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
ИС1	$4,9 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$

Резултатите от анализите, проведени в Лаборатория „ДНК-анализ“ на ЕЛБИ Булгарикум показват, че асоциацията от пробиотични щамове на млечнокисели микроорганизми, изолирана от изворна вода, съхранявана 22 месеца в проба ИС1 (от Март 2010 до Януари 2012) при температура 20°C-24°C, съдържа живи микроорганизми в количество, близко до тези, съдържащи се в пробата, произведена сравнително най-късно - проба ИВ1. Следователно пробиотичната асоциация от щамове на млечнокисели микроорганизми, изолирана от изворна вода запазва жизнеността си при продължително съхранение на стайна температура. Последното е от особено значение с оглед предлагането в търговската мрежа на диетичните продукти, произведени по технологията, съгласно изобретението.

Пример 6. Преживяемост в гастроинтестиналния тракт

Преживяемостта на микроорганизмите, съгласно изобретението е установена чрез третиране на рехидратирани продукти, произведени със стартерна култура, съгласно изобретението, с изкуствен стомашен и чревен сок. Този експериментален метод, с който се цели наподобяване преминаването на микроорганизмите през гастроинтестиналния тракт на човека при екстремални условия, включва етапи както следва:

Стъпка 1. Приготвя се изкуствен стомашен сок със състав: Pepsin (Sigma, P7000) - 0.175 % (w/v); NaCl - 0.2% (w/v); pH 2,5 и в 9 ml от него се поставя 1 ml от воден разтвор на Проба ИВ1 (разреждане 1:1). Получената проба, условно означена GJ, се инкубира при 37°C в анаеробна среда в продължение на 2 h. Отчитането на броя млечнокисели микроорганизми (cfu/ml) в проба GJ става към 0 h; 0,5 h; 1 h и 2 h.

Стъпка 2. 1 ml от проба GJ, инкубирана в продължение на 2 h, означена условно като проба GJ-2, се поставя в 9 ml чревен сок със състав NaCl - 0.2% (w/v); NaHCO<sub>3</sub> - 1.1%(w/v); Trypsin (Sigma, T7409) - 0.20.2% (w/v); bile salts (Oxoid, Code L55) - 0.9% и pH 8.0. Получената проба, условно означена като IJ, се инкубира при 37°C в анаеробна среда в продължение на 5 h. Броят на микроорганизмите в проба IJ се отчита към 0 h; 2.5 h и 5 h. Прагът на детекция на млечнокиселите микроорганизми при този анализ е 10<sup>3</sup> cfu/ml.

Резултатите за преживяемостта на пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, в лабораторно приготвени храносмилателни сокове са обобщени на Таблицы 5 и 6 по-долу. По-специално на Таблица 5 са представени резултатите за преживяемостта на отделните групи млечнокисели бактерии в продукт ИВ1 в изкуствен стомашен сок (проба GJ).

Таблица 5

Брой мк. в проба GJ (cfu/ml) Време на инкубиране на проба GJ	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> var. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> var. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Общ брой млечнокисели и микроорг.
0 часа	5,9 x 10 <sup>7</sup>	7,8 x 10 <sup>8</sup>	2,9 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>
0,5 час	4,8 x 10 <sup>7</sup>	6,1 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>7</sup>	2,5 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
1 час	3,7 x 10 <sup>7</sup>	5,7 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>
2 часа	1,3 x 10 <sup>7</sup>	2,5 x 10 <sup>8</sup>	9 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	3,6 x 10 <sup>7</sup>

От получените резултати, описани в Таблица 5 става ясно, че млечнокиселите бактерии в пробиотичен продукт ИВ1 преживяват в условията на изкуствен стомашен сок както следва: 83% преживяват 30 min; 68% преживяват 1 h, а 30% от тях преживяват 2 h.

Резултатите за преживяемостта на отделните групи млечнокисели бактерии в продукт ИВ1 в изкуствен чревен сок (проба IJ) е представено на Таблица 6 по-долу.

Таблица 6

Брой мк. в проба GJ (cfu/ml) Време на инкубиране на проба GJ	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> var. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> var. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Общ брой млечнокисели и микроорг.
0 час	1,3 x 10 <sup>7</sup>	2,5 x 10 <sup>8</sup>	9 x 10 <sup>8</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	3,6 x 10 <sup>7</sup>
2,5 часа	1,9 x 10 <sup>7</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	5,2 x 10 <sup>8</sup>	4,5 x 10 <sup>6</sup>	3,1 x 10 <sup>7</sup>
5 часа	8,7 x 10 <sup>5</sup>	6,8 x 10 <sup>5</sup>	9,2 x 10 <sup>4</sup>	8,8 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Резултатите, систематизирани в Таблица 6 показват, че около 10 % от млечнокиселите бактерии в рехидратирания пробиотичен продукт ИВ1 преживяват при екстремални експериментални условия и двете последователни стъпки на анализа - 2 h в изкуствен стомашен сок и след това 5 h в изкуствен чревен сок. Към седмия час на изследването в проба ИВ1 се съдържат живи пробиотични микроор-

ганизми в количество над  $10^7$ . От видовете млечнокисели бактерии, съдържащи се в проба ИВ1, с най-добра преживяемост е *Lactobacillus helveticus*.

Резултатите показват, че пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, проявява много добра преживяемост и е устойчива след рехидратация в екстремални експериментални условия на стомаха и червата на човека. Микроорганизмите, съдържащи се в диетичните продукти, съгласно изобретението, поставени в екстремални експериментални условия остават в количество над  $1 \times 10^7$ , което е достатъчно, за да се адхезират към стените на червата и да се размножават.

Пример 7. Доказване на антимикробна активност на пробиотичната асоциация

Антимикробната активност на пробиотичната асоциация е доказана чрез установяване на бактериостатичен и бактерициден ефект на проба от сух продукт (проба ИВ1) посредством ямков дифузионен метод. Изследвани са взаимоотношенията между лиофилизирания продукт и патогенни микроорганизми - еталонни култури, клинични изолати (чревни/фекални) и изолирани от храни патогени от следните видове: *Escherichia coli* серотипове O6, O44 и O127, *Salmonella* групи C, B, D; *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sakazakii* и *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*.

За целта, патогенните микроорганизми се посяват върху Nutrient agar (MERCK, 1.00427.0500), към който са добавени 0,5% жлъчни соли в концентрация  $10^5$  cfu/ml, а продукта предварително е рехидратиран със стерилна дестилирана вода в съотношение 1:3. Ямките, в които се накапва продукта са с обем 50  $\mu$ l. Посевките се инкубират за 24 h в анаеробна среда. Резултатите от експерименталното изследване спрямо патогенни микроорганизми, при които е наблюдаван бактерициден (БИ) и/или бактериостатичен (БС) ефект, са отчетени като милиметри стерилна зона или зона на потискане и са обобщени на Таблица 7 по-долу и показват, че продукта проявява добра антимикробна активност, включваща забележителен бактериостатичен ефект и умерен бактерициден ефект.

Таблица 7

ИВ1, рН 5,9

Патоген	БИ (mm)	БС (mm)
<i>P. mirabilis</i>	1	3
<i>Shigella flexneri</i>	0	3
<i>S. aureus</i> 381	5	5
<i>S. aureus</i> 746	2	4
<i>Salmonella</i> gr. B	0	2
<i>E. coli</i> O-44	0	2

Заедно с това, изследванията за безопасност на продукта, представени на Таблица 8 по-долу показват, че продуктите, съдържащи пробиотичната асоциация от млечнокисели микроорганизми, съгласно изобретението, са безопасни за прием от човека.

Таблица 8

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ	ХАРАКТЕРИСТИКА И НОРМИ	РЕЗУЛТАТИ
Тяжи метали и други токсични елементи, mg/kg, на порция от	Арсен по ЕДС EN 14048:2006 Свинец, кадмий и мед по ЕДС EN 14084:2003 Желязо по ЕДС EN 13806:2003	Мед – 3,0, олово – 1,0, арсен – 2,0; кадмий – 0,1, желязо – 0,01.	Отговори
Общ брой на мезофилните бактерии и факултативна анаеробна непатогенна микрофлора, CFU/g, на порция от	ЕДС ISO 6810	1000 ( $1,0 \cdot 10^3$ )	Отговори
Когниформ в 1,0 g от продукта:	ЕДС ISO 4931	Да не се установяват	Отговори
Плесени и дрожди в 1,0 g от продукта	ЕДС ISO 6611	Да не се установяват	Отговори
Спори на микроскопични плесени гъбички в 1,0 g от продукта:	ЕДС ISO 6611	Да не се установяват	Отговори
Байпасета зрелия в 0,25 g от продукта:	ЕДС ISO 6579	Да не се установяват	Отговори
Хомогенно-термоустойчиви стафилококи ( <i>S. aureus</i> ) в 1,0 g от продукта:	ЕДС ISO 6888 – 1 2, 3	Да не се установяват	Отговори
Листена патогенност в 25,0 g от продукта:	ЕДС ISO 11290 - 1	Да не се установяват	Отговори
Афлатоксин М1 mg/kg	ЕДС 16242 - 05	Не повече от 0,5	Отговори

Пример 8. Хранителна добавка за здравословно хранене на хора с кафе

За получаване на хранителна добавка за здравословно хранене на хора с кафе, към 4 g диетичен млечен продукт на основата на пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, получен както в Пример 3, се добавят 2 g инстантно кофейново или безкофейново кафе, 2 g суха сметана и 2 g декстроза монохидрат, сместа се хомогенизира и се опакова в алуминиево фолио.

Така полученият продукт има тонизиращ и здравословен ефект.

Пример 9. Хранителна добавка за здравословно хранене с екстракт на черна боровинка

За получаване на капсулна форма на диетичен продукт с екстракт на черна боровинка, към 240 mg продукт на основата на пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, получен както в Пример 5 се добавят 10 mg сух екстракт на черна боровинка, стандартизиран към 25%-но съдържание на антоцианиди и 20 mg декстроза монохидрат. Получената смес се хомогенизира и се поставя в растителна капсула.

Продуктът се използва като хранителна добавка за поддържане на общото здравословно състояние на хората и очното им здраве.

Пример 10. Хранителна добавка с екстракт на папая

За получаване на капсулна форма на диетичен продукт с екстракт на папая, към 250 mg продукт на основата на пробиотичната асоциация, съгласно изобретението, получен както в Пример 5 се добавят 15 mg сух екстракт на папая и 20 mg декстроза монохидрат. Получената смес се хомогенизира и се поставя в желатинова капсула. Продуктът е приложим за поддържане и оптимизиране на телесното телло.

## Патентни претенции

1. Асоциация от пробиотични млечнокисели микроорганизми, изолирана от природен водоизточник, включваща шамовете млечнокисели микроорганизми, депозираны в Чешката колекция за микроорганизми (ССМ) както следва:

- шам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DWT1, регистриран в ССМ с № 7992;
- шам *Lactobacillus helveticus* DWT2, регистриран в ССМ с № 7993;
- шам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DWT3, регистриран в ССМ с № 7994;
- шам *Streptococcus thermophilus* DWT4, регистриран в ССМ с № 7992;
- шам *Streptococcus thermophilus* DWT5, регистриран в ССМ с № 7993;
- шам *Streptococcus thermophilus* DWT6, регистриран в ССМ с № 7994;
- шам *Streptococcus thermophilus* DWT7, регистриран в ССМ с № 7995 и
- шам *Streptococcus thermophilus* DWT8, регистриран в ССМ с № 7996.

2. Метод за получаване на диетичен млечен продукт от пробиотичната асоциация съгласно претенция 1, посредством заквасване със стартерна култура, ферментация и лиофилизация, характеризиращ се с това, че за получаване на стартерната култура, изолираните от природен водоизточник шамове млечнокисели микроорганизми се улавят и размножават чрез заквасване на стандартизирано и пастеризирано мляко с изворна вода в съотношение 2:1, а получената биомаса се влага в стандартизирано и пастеризирано мляко в съотношение 10:0,3 с последваща ферментация и лиофилизация.

3. Диетичен млечен продукт съгласно претенции 1 и 2, характеризиращ се с това, че след лиофилизация съдържа живи клетки от пробиотичната асоциация в концентрация от  $8,0 \times 10^7$  cfu/g до  $1,2 \times 10^8$  cfu/g, от които концентрацията на живи клетки от шамовете *Streptococcus thermophilus* е в границите от  $4,6 \times 10^7$  cfu/g до  $5,9 \times 10^7$  cfu/g, в това число шам *Streptococcus thermophilus* DWT4, регистриран в ССМ с № 7992, шам *Streptococcus thermophilus* DWT5, регистриран в ССМ с № 7993, шам *Streptococcus thermophilus* DWT6, регистриран в ССМ с № 7994, шам *Streptococcus thermophilus* DWT7, регистриран в ССМ с № 7995 и шам *Streptococcus thermophilus* DWT8, регистриран в ССМ с № 7996, а концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, регистриран в ССМ с № 7994 е в границите от  $6,1 \times 10^6$  cfu/g до  $7,8 \times 10^6$  cfu/g, концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, регистриран в ССМ с № 7992 е в границите от  $1,4 \times 10^7$  cfu/g до  $2,9 \times 10^7$  cfu/g и концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus helveticus*, регистриран в ССМ с № 7993 е в границите от  $1,4 \times 10^7$  до  $2,8 \times 10^7$  cfu/g.

4. Диетичен млечен продукт съгласно претенции от 1 до 3, характеризиращ се с това, че след съхранение на температура от 20°C до 24°C в продължение на повече от 22 месеца съдържа концентрация на живи клетки от пробиотичната асоциация от  $8,0 \times 10^7$  cfu/g до  $1,2 \times 10^8$  cfu/g, от които концентрацията на живи клетки от шамовете *Streptococcus thermophilus* е в границите от  $4,6 \times 10^7$  cfu/g до  $5,9 \times 10^7$  cfu/g, в това число шам *Streptococcus thermophilus* DWT4, регистриран в ССМ с № 7992, шам *Streptococcus thermophilus* DWT5, регистриран в ССМ с № 7993, шам *Streptococcus thermophilus* DWT6, регистриран в ССМ с № 7994, шам *Streptococcus thermophilus* DWT7, регистриран в ССМ с № 7995 и шам *Streptococcus thermophilus* DWT8, регистриран в ССМ с № 7996, а концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, регистриран в ССМ с № 7994 е в границите от  $6,1 \times 10^6$  cfu/g до  $7,8 \times 10^6$  cfu/g, концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, регистриран в ССМ с № 7992 е в границите от  $1,4 \times 10^7$  cfu/g до  $2,9 \times 10^7$  cfu/g и концентрацията на живи клетки от шам *Lactobacillus helveticus*, регистриран в ССМ с № 7993 е в границите от  $1,4 \times 10^7$  до  $2,8 \times 10^7$  cfu/g.

5. Диетичен млечен продукт съгласно претенции от 1 до 4, характеризиращ се с това, че след рехидратация и при експериментални екстремални условия на стомашно-чревния тракт съдържа концентрация на живи клетки от пробиотичната асоциация не по-малко от  $1,1 \times 10^7$  cfu/g.

6. Хранителна добавка за здравословно хранене на хора, характеризираща се с това, че включва диетичният млечен продукт съгласно претенции от 3 до 5 в комбинация с инстантно кафе и/или какао и/или сух екстракт на черна боровинка и/или сух екстракт на папая и/или масла и/или сухи

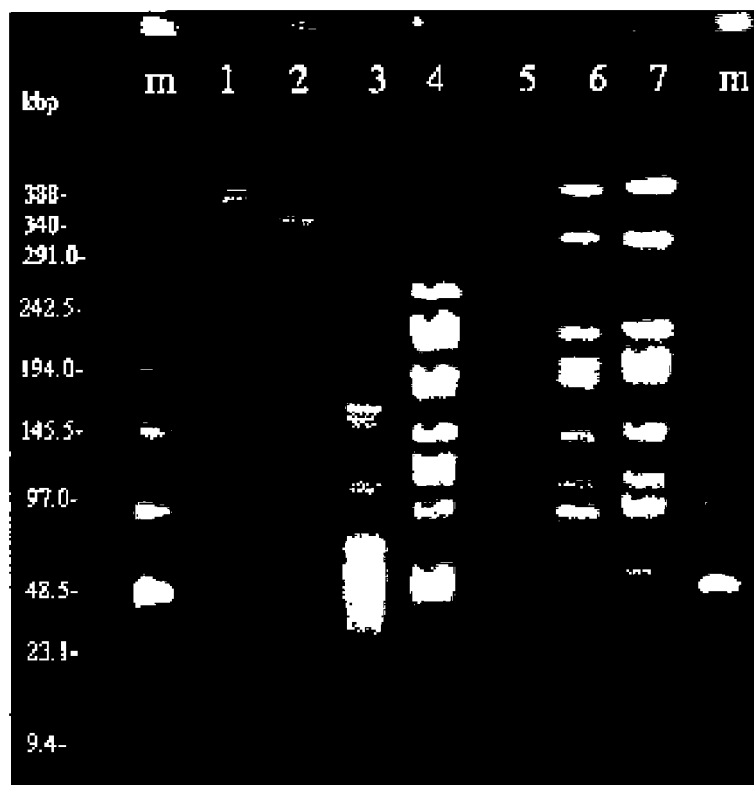
добавки, избрани от групата, включваща растителни екстракти, фибри, ензими и мед.

### Приложение: 13 фигури

#### Литература

1. Чомаков, Х., „Пробиотици - Минало, настояще и бъдеще“, стр. 31-41, изд. Ес Принт, С, 2007.
2. Simonds, J. Hansen P, A. Laikshmanan S (1971) J. Bacteriol. 107, 382-384.
3. Clare M. Hasler, Functional foods for Health Program. University of Illinois, Urbana, Illinois, “The Changing Face of Functional Foods”, published by the American College of Nutrition.
4. Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. Food Technol. 1993; 46: 126-135.
5. Gomes et al., 1995; Rybka and Kailasapathy, 1995; Blanchette et al., 1996; Gomes and Malcata, 1999; Vinderola et al., 2000.
6. Giraffa G., De Vecchi P. and Rosetti L, Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis, J. Appl. Microbiol. 1998, 85, 918-924.
7. Lick S., Keller M., Bockelmann W., Heller K.J., Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer specific PCR amplification based on its *lacZ* gene, System. Appl. Microbiol. 1996, 19, 74-77.
8. Nomura M., Kobayashi M., Okamoto T., Rapid PCR - based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies, Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68(5), 2209-2213.
9. Ke D. J., Picard F. J., Martineau F., Menard C., Roy P. H., Ouelette M & Bergeron M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 3497-3503.
10. Probiotics in food, Report of a Joint FAO/WHO experts on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid bacteria, Cordoba, Argentina, 1-3 October, 2001, FAO Food and Nutritional Paper 85.

МАКРОРЕСТРИКЦИОННИ ПРОФИЛИ НА ИЗСЛЕДВАНИ ИЗОПАТИ МЛЕЧНОКИСЕЛИ  
БАКТЕРИИ

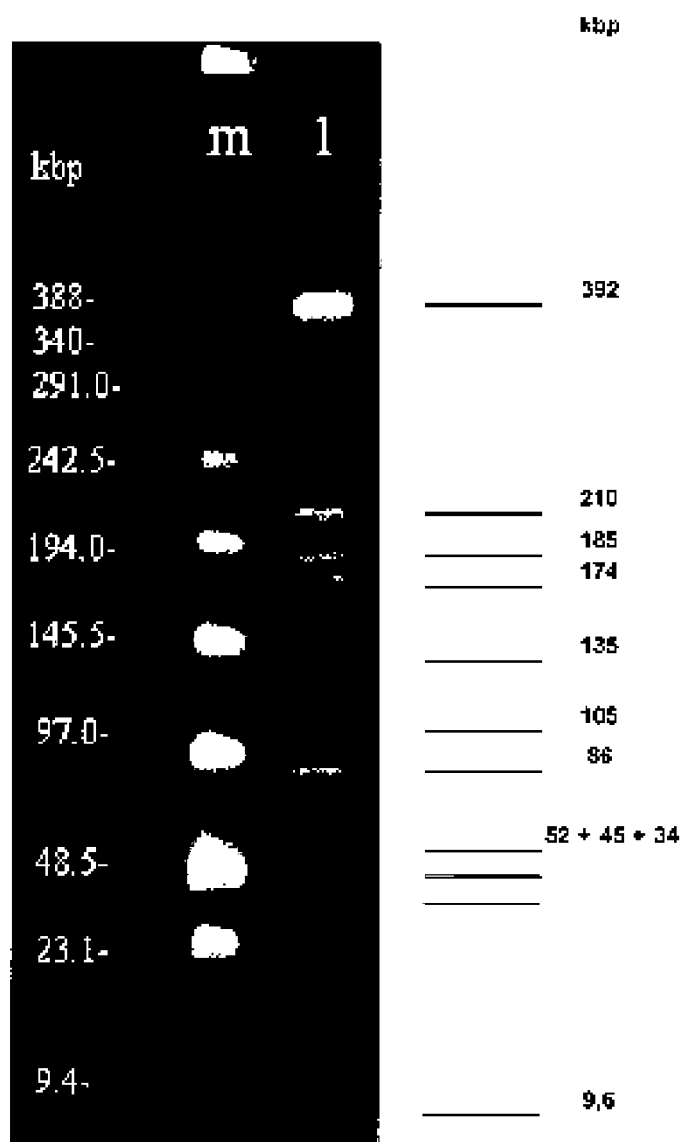


Фигура 1. Макрорестрикционен профил, получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолати на *Streptococcus thermophilus* от проба ИН1

Легенда.

- Пътека 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22
- Пътека 2 – изолат *Streptococcus thermophilus* i21
- Пътека 3 – изолат *Streptococcus thermophilus* i24
- Пътека 4 – изолат *Streptococcus thermophilus* i26
- Пътека 5 – изолат *Streptococcus thermophilus* i31
- Пътека 6 – изолат *Streptococcus thermophilus* i32
- Пътека 7 – изолат *Streptococcus thermophilus* i34
- m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



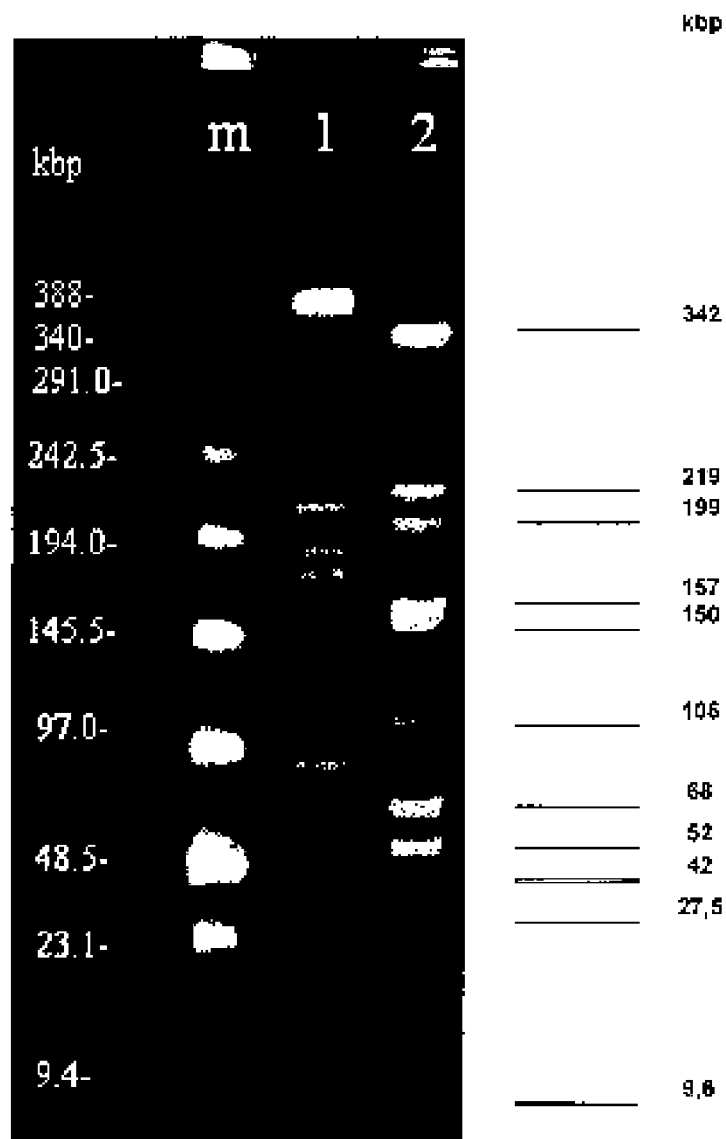


Фигура 3. Макрорестриционен профил получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолат *Streptococcus thermophilus* i22 от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

Легенда

Пътека 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22

m – лусов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



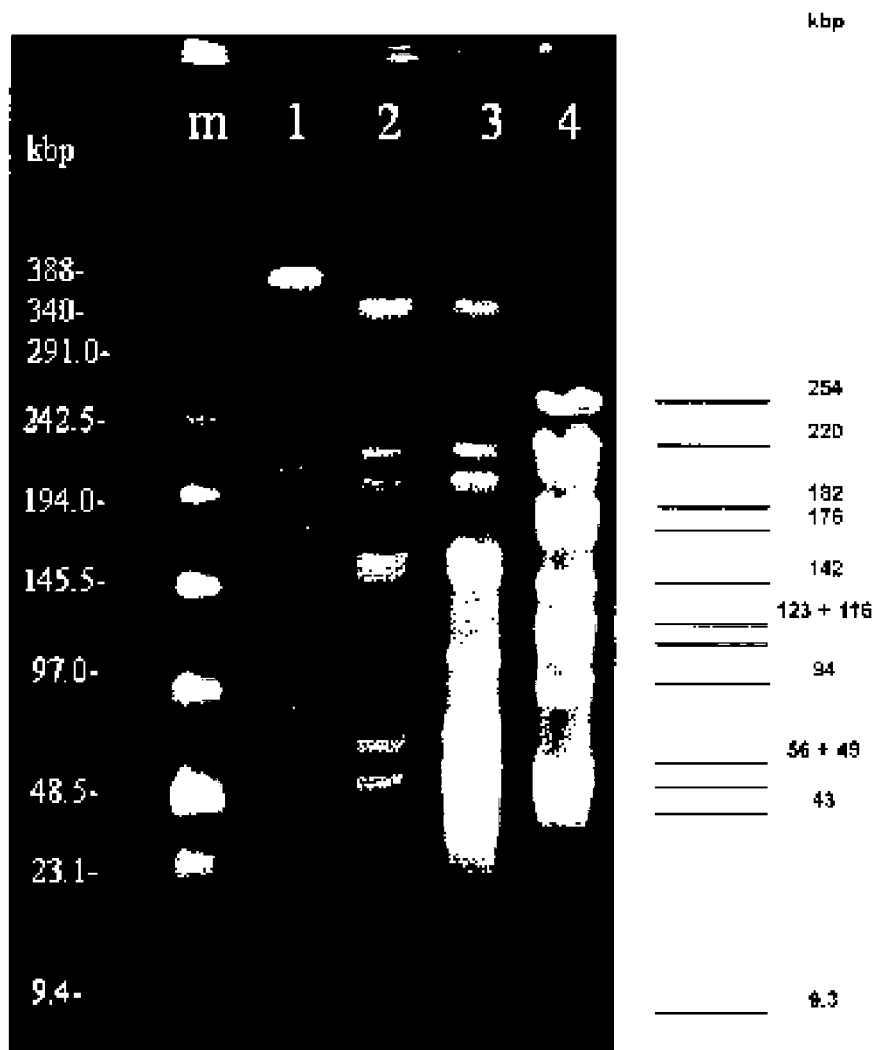
Фигура 4 Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *SmaI* на геномна ДНК от изолат *Streptococcus thermophilus* i21 от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

Легенда:

Пътка 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22

Пътка 2 – изолат *Streptococcus thermophilus* i21

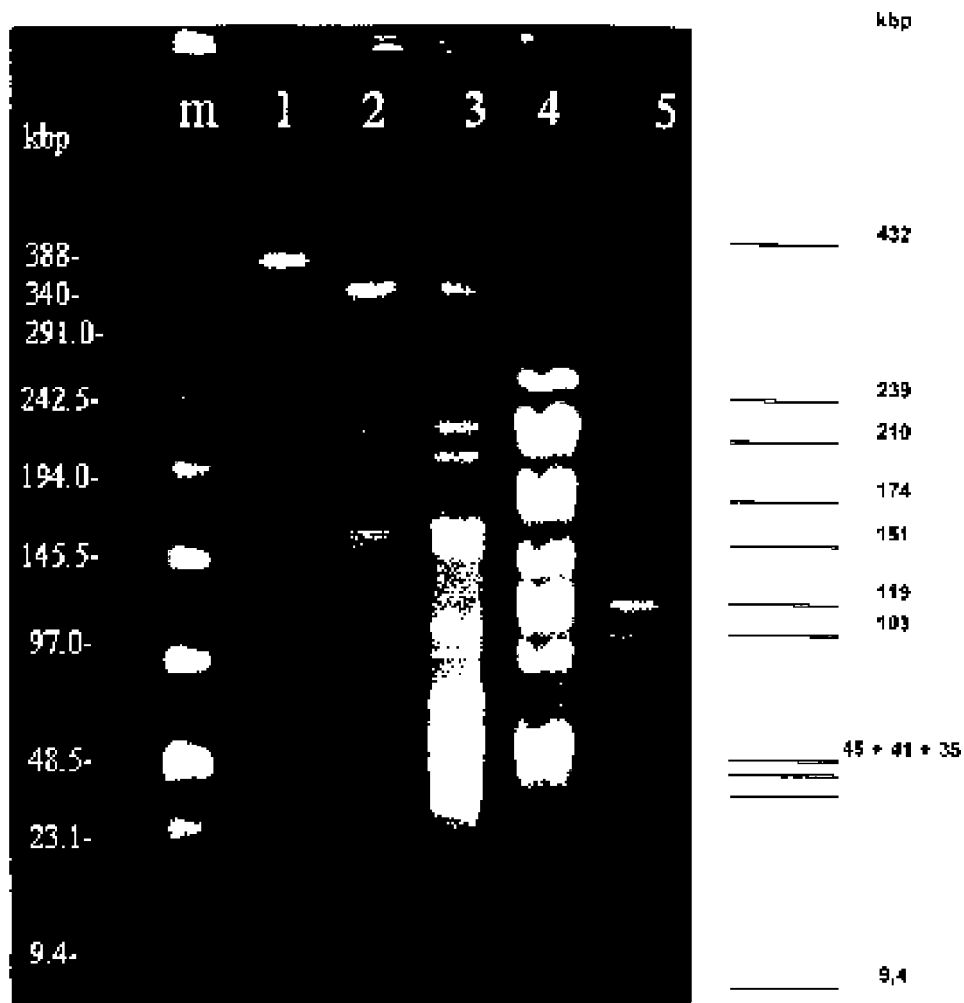
m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



Фигура 5. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолат *Streptococcus thermophilus* i26 от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

Легенда:

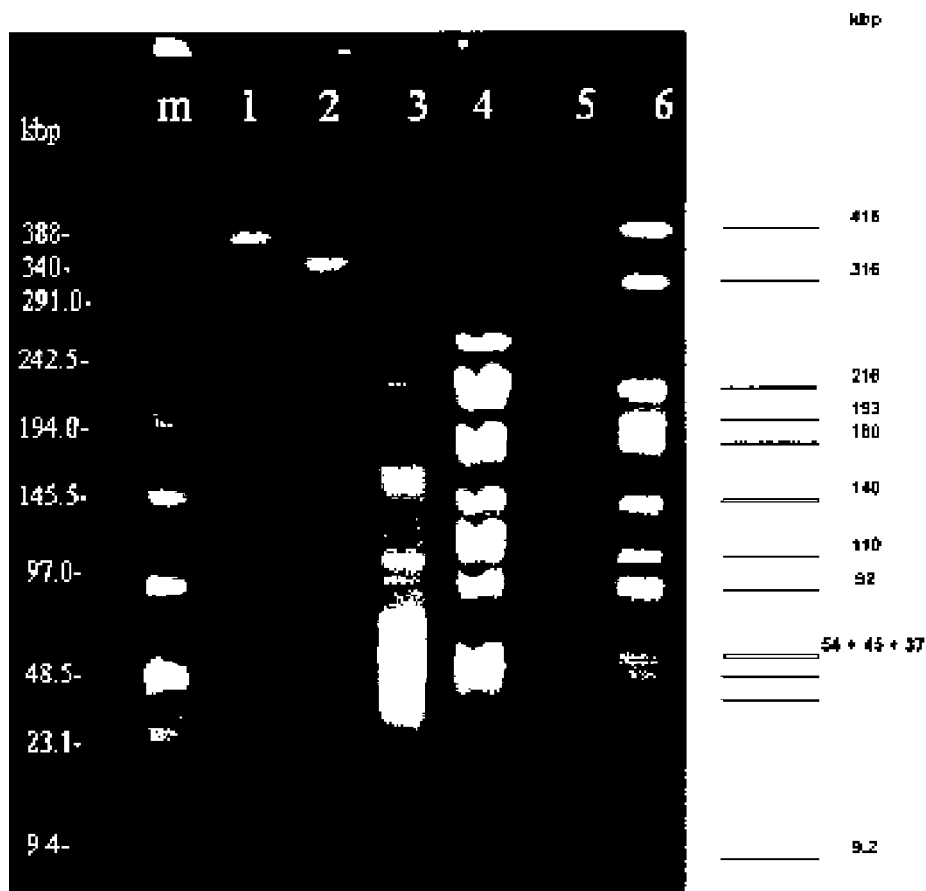
Пътека 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22  
 Пътека 2 – изолат *Streptococcus thermophilus* i21  
 Пътека 3 – изолат *Streptococcus thermophilus* i24  
 Пътека 4 – изолат *Streptococcus thermophilus* i26  
 m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



Фигура 6. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолат *Streptococcus thermophilus* i31 от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

**Легенда:**

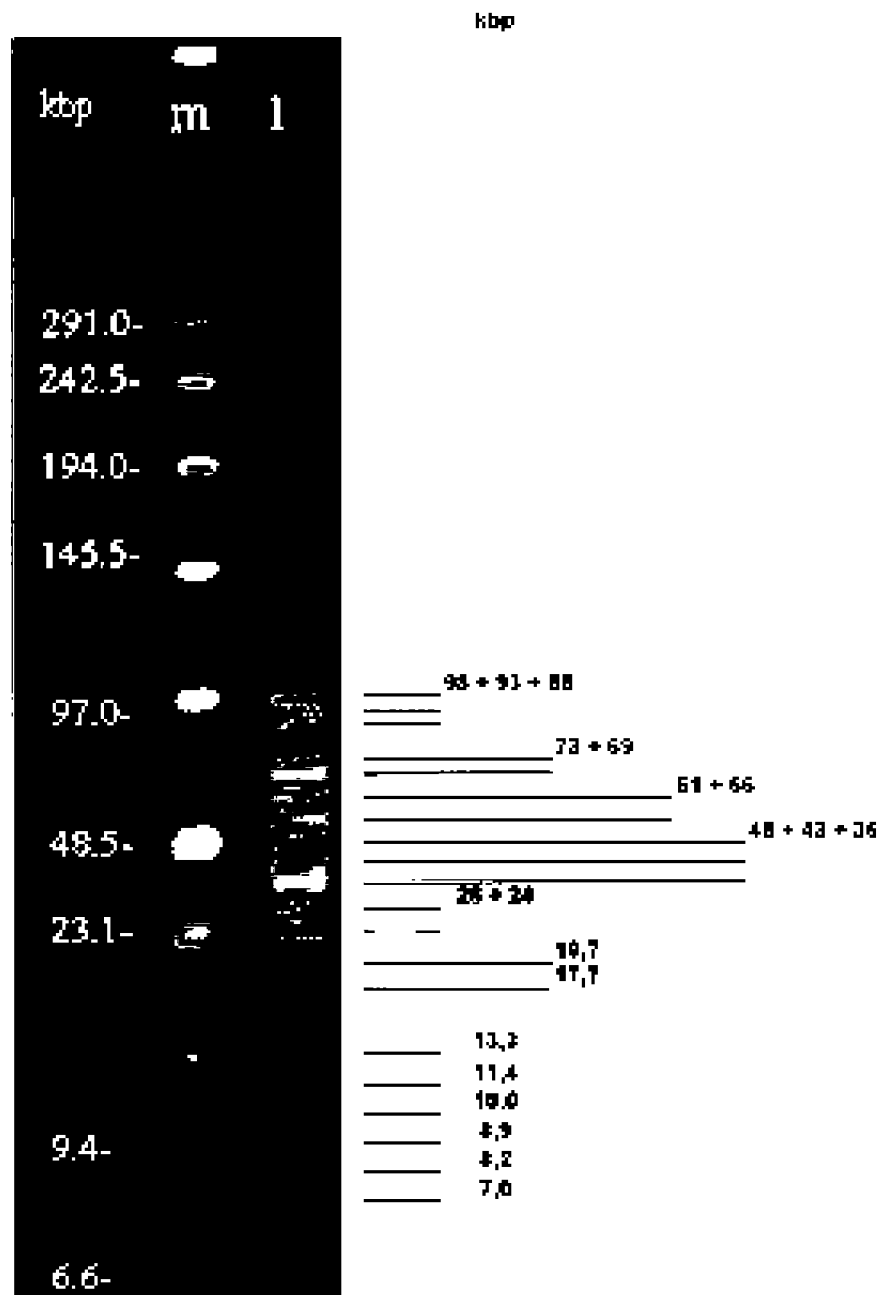
- Пътека 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22
- Пътека 2 – изолат *Streptococcus thermophilus* i21
- Пътека 3 – изолат *Streptococcus thermophilus* i24
- Пътека 4 – изолат *Streptococcus thermophilus* i26
- Пътека 5 – изолат *Streptococcus thermophilus* i31
- m – пулсов маркер 0.1-200 kbp (Sigma)



Фигура 7. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолат *Streptococcus thermophilus* i32 от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

Легенда:

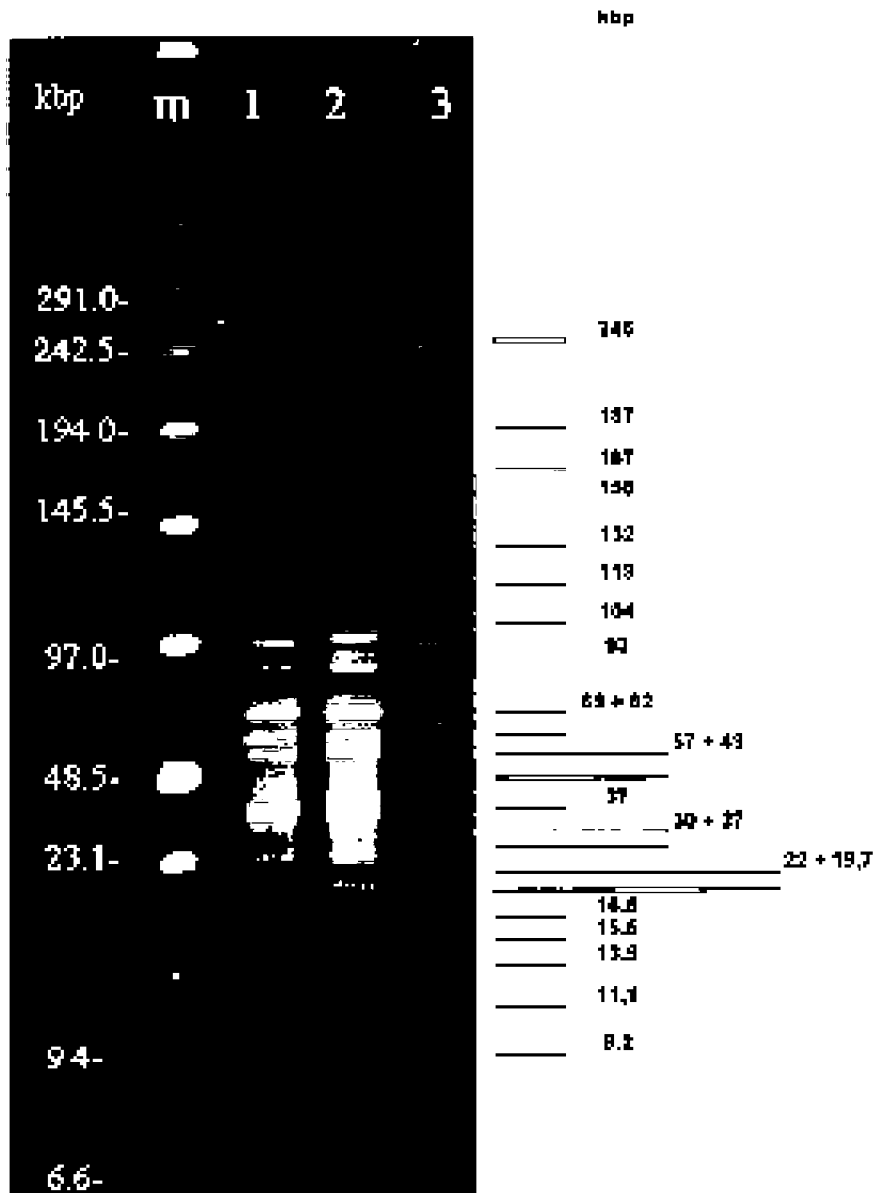
- Пътека 1 – изолат *Streptococcus thermophilus* i22  
 Пътека 2 – изолат *Streptococcus thermophilus* i21  
 Пътека 3 – изолат *Streptococcus thermophilus* i24  
 Пътека 4 – изолат *Streptococcus thermophilus* i26  
 Пътека 5 – изолат *Streptococcus thermophilus* i31  
 Пътека 6 – изолат *Streptococcus thermophilus* i32  
 m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



Фигура 8. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима XhoI на геномна ДНК от изolat *Lactobacillus helveticus* H11 от проба М Н1 с указани размери на получените рестриктни фрагменти

Легенда

Плътен 1 – изolat *Lactobacillus helveticus* H11  
 m – пулсов маркер 0.1-200 kbp (Sigma)



Фигура 8. Макрорестриктозен профил получен след рестрикция с ензима *Xba*I на геномна ДНК от изолати *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (2m) от проба И Н1 с указани размери на получените рестриктиви фрагменти

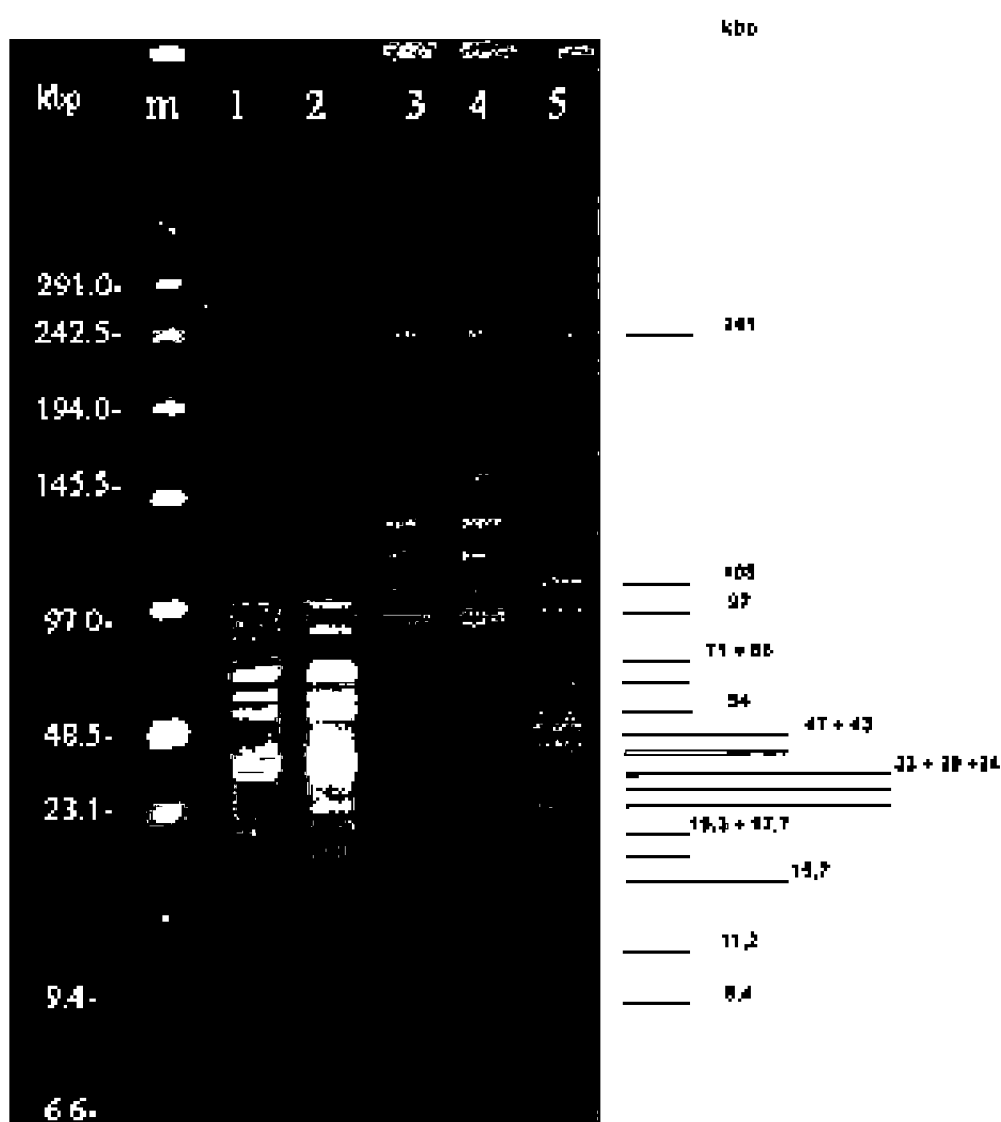
#### Легенда

Пътка 1 – изолат *Lactobacillus helveticus* (1m)

Пътка 2 – изолат *Lactobacillus helveticus* (2m)

Пътка 3 – изолат *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (2m)

m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



Фигура 10. Макрорестриционен профил получен след рестрикция с ензимът XhoI на геномния ДНК от изолати *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* (3L) от проба И И1 с указани размери на получените рестриктиви фрагменти

**Легенда.**

Пътка 1 – изолат *Lactobacillus helveticus* 47m

Пътка 2 – изолат *Lactobacillus helveticus* 15m

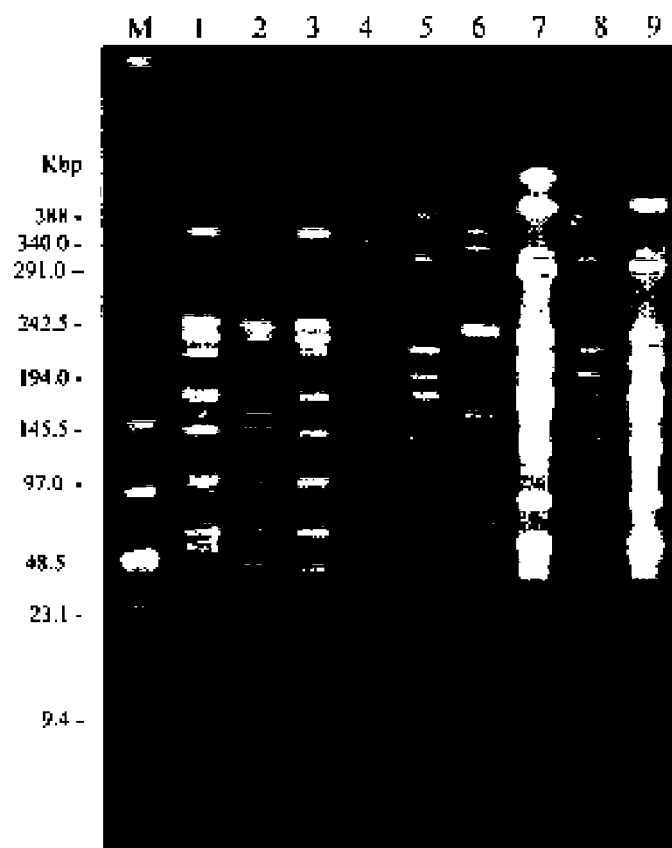
Пътка 3 – изолат *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 2m

Пътка 4 – изолат *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 4s

Пътка 5 – изолат *L. delbrueckii ssp. lactis* (3L)

m – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)

МАКРОРЕСТРИКЦИОННИ ПРОФИЛИ НА ИЗСЛЕДВАНИ ИЗОЛАТИ МЛЕЧНОКИСЕЛИ  
БАКТЕРИИ



Фигура 11. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Sma*I на геномна ДНК от изолати *Streptococcus thermophilus* от изследваните проби

Легенда:

Пътека 5 – Проба П2, изолат *Streptococcus thermophilus* Пк2/1

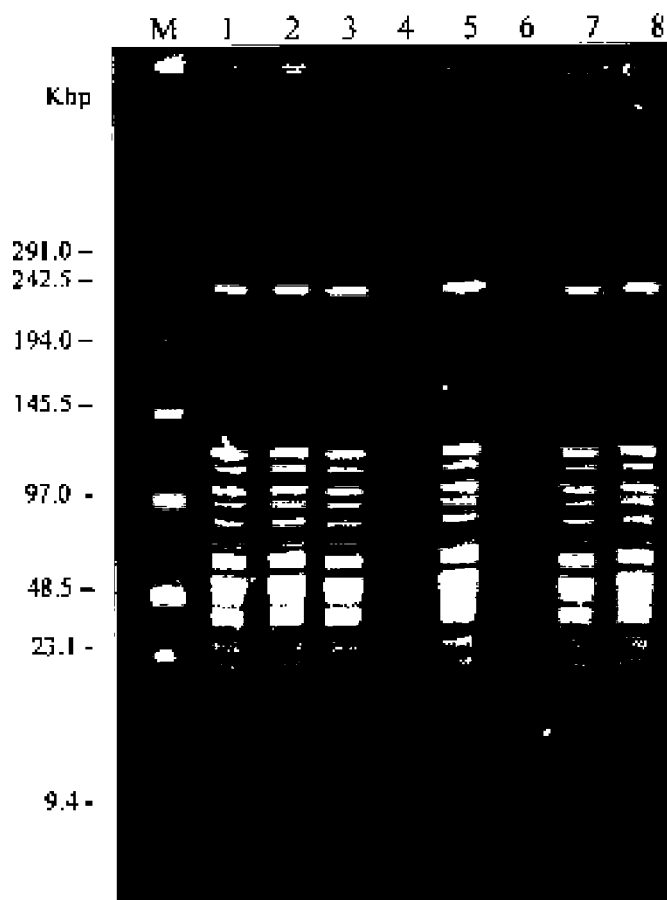
Пътека 6 – Проба П2, изолат *Streptococcus thermophilus* Пк2/2

Пътека 7 – Проба П1, изолат *Streptococcus thermophilus* Пк1/1

Пътека 8 – Проба П1, изолат *Streptococcus thermophilus* Пк1/2

Пътека 9 – Проба П1, изолат *Streptococcus thermophilus* Пк1/3

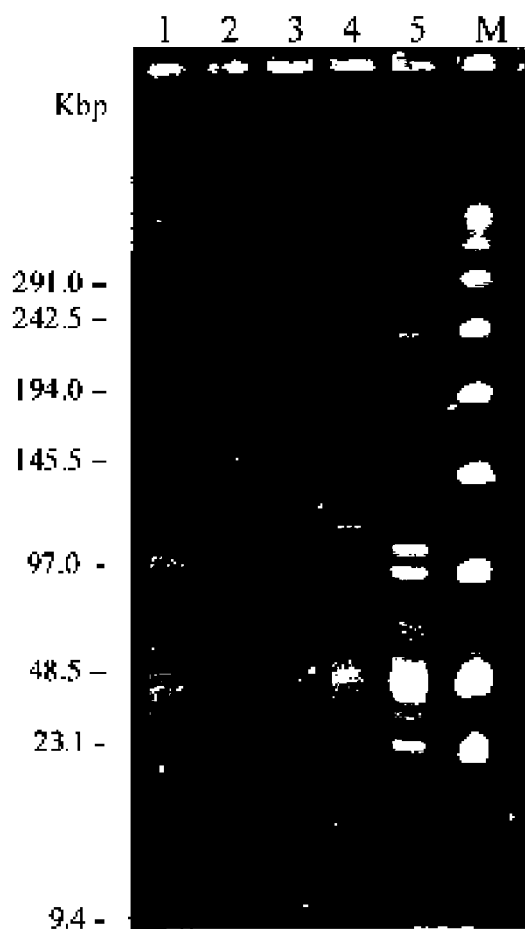
M – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



Фигура 12. Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Xho*I на геномна ДНК от изолати *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* от изследваните проби

Легенда.

- Пътека 1 – Проба П3, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп3/1  
 Пътека 2 – Проба П3, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп3/3  
 Пътека 3 – Проба П3, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп3/5  
 Пътека 4 – Проба П3, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп3/6  
 Пътека 5 – Проба П2, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп2/2  
 Пътека 6 – Проба П2, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп2/3  
 Пътека 7 – Проба П2, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп2/4  
 Пътека 8 – Проба П2, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп2/5  
 M – пулсов маркер 0,1-200 kbp (Sigma)



**Фигура 13.** Макрорестрикционен профил получен след рестрикция с ензима *Xho*I на геномна ДНК от изолати *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* от изследваните проби

Легенда:

Пътека 1 – Проба П3, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп3/6

Пътека 2 – Проба П2, изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* Пп2/3

Пътека 5 – Изолат *L. delbrueckii* ssp. *lactis* i3L от проба И Н1(Протокол 24.в.11г.)

M – пулсов маркер 0.1-200 kbp (Sigma)