

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu

300 143

(13) Druh dokumentu **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1983**
(22) Přihlášeno: **08.12.1998**
(30) Právo přednosti: **08.12.1997 SE 1997/9704577**
(40) Zveřejněno: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)
(47) Uděleno: **15.01.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku **25.02.2009**
(Věstník č. 8/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/SE1998/002263**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/029833**

(56) Relevantní dokumenty

Mercenier, a. et al., "Development of Lactic Acid Bacteria as Live Vectors for Oral or Local Vaccines", *Advances in food sciences*, Vol. 18(3-4), 73-77, 1996; Harty D.W. et al., "Pathogenic Potential of Lactobacilli", *Int. J. Food Microbiol.*, Vol 24(1-2), 179-189, 1994; Klein G. et al., "Intra-species characterization of clinical isolates and biotechnologically used strains of *Lactobacillus rhamnosus* by analysis", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 25(3), 263-275, 1995; Gilliland S.E. et al., "De Conjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli", *Appl. Environ Microbiol.*, 33(1), 15-18, 1977

(73) Majitel patentu:

ARLA FOODS AB, Stockholm, SE

(72) Puvodce:

Wadström Torkel, Lund, SE

Aleljung Per, Lund, SE

Svensson Ulla, Lund, SE

Fonden Rangne, Stockholm, SE

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000

(54) Název vynálezu

Kmen *Lactobacillus*, jeho použití a výrobek jej obsahující

(57) Anotace:

Kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, který je gram-pozitivní, tyčinkovitá bakterie schopná produkovat kyselinu L-mléčnou a obsahuje tři plazmidy o velikosti 2,2, 4,36 a 9,1 tisíce bází, který je odolný in vitro ke kyselině chlorovodíkové a žaludečním šťávám, a který dobře přežívá průchod žaludkem a zažívacím traktem, a který roste optimálně při 37 °C, je vhodný jako probiotický přípravek v potravě a jako přírodní léčivo. Řešení se také vztahuje na výrobky obsahující tento kmen příp. obsahující koncentrát tohoto kmene.

CZ 300143 B6

Kmen *Lactobacillus*, jeho použití a výrobek jej obsahující

Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, z něho připravených prostředků vhodných pro použití jako potrava a rovněž výrobků, obsahujících tento kmen.

Dosavadní stav techniky

10

Kmen *Lactobacillus paracasei* je gram-pozitivní, homofermentativní, tyčinkovitá bakterie, vyskytující se mimo jiné v lidském zažívacím traktu.

15

Podstata vynálezu

Vynález se týká kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, LMG P-17806, který je gram pozitivní, homofermentativní, tyčinkovitá bakterie schopná produkovat kyselinu L-mléčnou a obsahuje tři plazmidy o velikosti 2,2, 4,36 a 9,1 tisíce bází, kde samostatně je kmen vhodný jako probiotický přípravek v potravě a jako přírodní léky, který je odolný *in vitro* ke kyselině chlorovodíkové a žaludeční šťávě, snáší žlučové soli a přitom je nerozkládá, zatímco probíhá jejich silné vstřebávání, a který dobře přežívá průstup žaludkem a zažívacím traktem a který roste optimálně při 37 °C.

25

Nový kmen (který bude dále pro jednoduchost označován LMG P-17806), je variantou druhu *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Má charakteristické rysy druhu s obsahem GC 44%. LMG P-17806 byl izolován ze vzorků mikroflóry lidského zažívacího traktu. LMG P-17806 je gram-pozitivní, homofermentativní, tyčinkovitá bakterie. Vytváří kyselinu L-mléčnou (levotočivý stereoizomer kyseliny mléčné) a roste optimálně při teplotě 37 °C. Kmen je charakteristický tím, že je *in vitro* tolerantní ke kyselině chlorovodíkové a žaludeční šťávě, toleruje žlučové soli bez toho, že by je rozkládal a má vyšší schopnost vstřebávat cholesterol. Kmen je také charakteristický tím, že obsahuje tři plazmidy o velikosti 2,2, 4,36 a 9,1 kb (kilobázi). Dalšími charakteristickými vlastnostmi je, že kmen fermentuje ribózu, adonitol, galaktózu, glukózu, fruktózu, manózu, sorbózu, manitol, sorbitol, N-acetyl-glukozamin, eskulin, celobiózu, maltózu, laktózu, sacharózu, trehalózu, inulin, melezitózu, D-turanózu a D-tagatózu. Na druhé straně nefermentuje glycerol, erythritol, D- a L-arabinózu, D- a L-xylózu, β -methyl-D-xylozid, rhamnózu, dulcitol, inozitol, α -methyl-D-manozid, α -methyl D glykozid, amygdalin, arbutin, salicin, melibiózu, rafinózu, škrob, glykogen, xylitol, gentiobiózu, D-lyxózu, D- a L-fukózu, D- a L-arabitol a 2- a 5-ketoglukonát.

40

Kmen byl charakterizován SDS gelovou elektroforézou, při níž byl porovnáván se šesti jinými kmeny *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Při tomto porovnání se ukázalo, že je odlišný od všech ostatních popisovaných kmenů a současně, když je porovnán s jinými laktobacily, zdá se patřit k označenému druhu. Byl také charakterizován pokud se týká ribozomální RNA pomocí metody nazvané Riboprinter®. Pomocí této metody bylo ukázáno, že kmen vykazuje 76% podobnost s typovým kmenem pro *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a 72% podobnost s typovým kmenem pro *Lactobacillus casei*, který byl analyzován při téže příležitosti.

45

Kmen byl uložen v Belgické uspořádané sbírce mikroorganismů (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM), sbírka LMG a bylo mu přiděleno přístupové číslo LMG P-17806.

50

Výhody kmene

Kmen LMG P-17806 má, ve srovnání se známými kmeny *Lactobacillus*, zásadní výhody při použití jako probiotický přípravek v potravě a jako přírodní léky tím, že obsahuje jedinečnou kombinaci vhodných vlastností:

- kmen má dobrou odolnost proti žaludečním šťávám a žlučovým kyselinám, ale na rozdíl od mnoha jiných kmenů nerozkládá žlučové soli;
- má velkou schopnost asimilovat cholesterol;
- kmen dobře prochází žaludkem;
- kmen má vliv na podmínky v modelu tlustého střeva tím, že v něm zvyšuje tvorbu kyseliny L–mléčné;
- kmen není více zánětlivý než jsou běžné jogurtové bakterie;
- kmen chrání střevní buňky před napadením patogenními organizmy, jako je *Salmonella typhimurium*;
- kmen působí antagonisticky proti bakterii způsobující žaludeční vřed – *Helicobacter pylori*;
- kmen vytváří baktericiny aktivní proti klostridiím;
- kmen dobře přežívá ve mléku a rovněž ve zmrazeném a vysušeném stavu;
- kmen na rozdíl od většiny jiných laktobacilů má příznivý vliv na chuť fermentovaných mléčných výrobků (nezpůsobuje žádnou příchut').

Uváděný kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* může být použit jako přísada do potravin nebo jako přírodní lék, jako tzv. „Léčebná strava“ nebo jako přísada k přírodnímu léku.

Takové léky mohou být použity pro děti za účelem zmírnění atopických problémů; pro starší osoby aby se upravila pozměněná mikroflóra, způsobená buď normálními změnami v průběhu stárnutí nebo změnou vylučování kyseliny chlorovodíkové; a pro lidi obecně, aby se normalizovala střevní flóra, vzhledem k tomu, že obsah klostridiových bakterií je snižován, obsah laktobacilů a buřidobakterií je zvyšován a vysoký obsah konformních bakterií je snižován.

Těmito svými vlastnostmi se kmen LMG P-17806 liší od dříve známých kmenů, což bude ukázáno na příkladech dále.

Příprava kmene

Kmen je připraven způsobem běžným pro laktobacily. Je použit substrát vhodný pro laktobacily. Tento substrát by měl například obsahovat alespoň jeden z cukrů, které je kmen schopen fermentovat, podle toho co bylo řečeno výše, v kombinaci s proteiny, vitamíny, minerály a jinými živinami, které jsou normálně laktobacily vyžadovány. Příklady běžných komerčně dostupných substrátů jsou bujon obsahující kvasničný extrakt a glukózu, MRS (de Man–Rogosa–Sharp bujón), Rogosa, mléko s přidaným malým množstvím kvasničného extraktu atd. Kmen je kultivován s minimálním množstvím kyslíku nebo při úplné nepřítomnosti kyslíku, vhodně při teplotě mezi +15 až +42 °C. Jestliže je substrát naočkován 0,1 až 1,0 % očkovací kultury, je vhodná kultivační doba mezi 10 a 40 hodinami. Kmen může být, pokud je to požadováno, koncentrován centrifugací nebo filtrací a potom je koncentrát promyt, aby se odstranilo kultivační médium. Koncentrát může být potom běžným postupem zmrazen nebo lyofilizován. Tímto způsobem lze připravit přípravky se 100 miliony až 100 000 miliony živých bakterií LMG P-17806 na gram. Přípravky mohou být potom použity jako takové nebo je lze použít jako přídavky do potravy, například do mléka nebo jiných výrobků, které dávají LMG P-17806 možnost přežít a pokud je to žádoucí i růst.

A. Výzkum týkající se průchodu kmene zažívacím traktem

- LMG P-17806 byl kultivován výše popsaným způsobem a přidán spolu s jogurtem do mléka. Fermentovaný produkt byl vytvořen inkubací mléka po dobu 5 hodin při 42 °C. Byl získán chutný výrobek, obsahující 100 milionů živých bakterií LMG P-17806 v 1 gramu výrobku. Zdravé osoby dostávaly 3 x 200 g tohoto výrobku denně po dobu 1 týdne. Celkový příjem LMG P-17806 byl mezi 40 až 200 miliardami.
- Vzorky stolice byly testovány před příjmem, po jednom týdnu přijímání a jeden týden potom, co byl příjem ukončen. Jak je vidět dále z tabulek 1 a 2, u testovaných osob bylo zjištěno silné zvýšení počtu laktobacilů. U každé testované osoby byla při každé příležitosti u dvou izolátů určena druhová příslušnost, tj. celkem u 20 izolátů. Osmnáct izolátů z období příjmu se podle fenotypové klasifikace skládalo z LMG P-17806. Tento bakteriální kmen se ve vzorcích neobjevoval ani před, ani po příjmu LMG P-17806 v potravě.

V průměru byl obsah ve vzorcích stolice v období příjmu v potravě velmi vysoký a pouze slabě se měnil od 63 milionů do 320 milionů na gram, tj. v rámci pětinasobku. Pozoruhodné bylo, že obsah byl do značné míry stejný nezávisle na tom, jaký obsah byl měřen před počátkem pokusu. Po ukončení příjmu v potravě se obsah vrátil k tomu, co se zdálo být přirozené pro testovaného jedince.

V tabulkách 1 a 2, uvedených dále, byl zjišťován obsah laktobacilů ve stolici, vyjádřeno v milio-
nech na gram, testováno vyšetím na substrátu Rogosa.

Tabulka 1

Pět testovaných jedinců s původně nízkým obsahem laktobacilů

Testovaný jedinec	Před pokusem	Během pokusu	Po pokusu
1	0,05	120	0,07
2	0,15	320	0,12
3	0,08	97	0,14
4	0,009	63	0,02
5	<0,001	278	0,002

Tabulka 2

Pět testovaných jedinců s vysokým obsahem laktobacilů

Testovaný jedinec	Před pokusem	Během pokusu	Po pokusu
6	1,2	297	1,3
7	0,7	83	0,6
8	0,2	136	0,18
9	4,3	74	3,5
10	0,6	212	0,8

Testování ukázalo, že kmen dobře přežívá při průchodu zažívacím traktem.

B. Výzkum týkající se tvorby kyseliny L–mléčné tímto kmenem na modelu tlustého střeva

- 5 Výše uvedený fermentovaný produkt byl přidán do tzv. SHIME–reaktoru, který je *in vitro* modelem střeva. Vzorky byly odebírány z těch částí reaktoru, které odpovídají nejdůležitějším částem tlustého střeva. Podobné srovnávací testy byly provedeny s některými jinými kmeny Lactobacillus, mimo jiné těsně příbuznými s kmenem L. paracasei subsp. paracasei. Jak je zřejmé z dále následující tabulky 3, LMG P–17806 způsobuje silné zvýšení produkce kyseliny L–
10 mléčné, která je jediným izomerem kyseliny mléčné, který je vytvářen kmenem LMG P–17806. Tvorba kyseliny mléčné je považována za výhodnou z několika důvodů, mimo jiné pro antibakteriální účinek kyseliny mléčné a rovněž kvůli tomu, že o nižším pH se předpokládá, že snižuje dostupnost a tvorbu dusíkatých sloučenin.

15

Tabulka 3

Tvorba kyseliny L– a D–mléčné v SHIME–reaktoru po přidání různých laktobacilů (v mg na litr obsahu reaktoru)

20

Kmen laktobacilu	Reaktor 4		Reaktor 5		Reaktor 6	
	L	D	L	D	L	D
LMG P-17806	300	80	500	100	280	90
L. paracasei	40	80	200	70	130	40
L. rhamnosus	90	10	10	70	80	10
L. plantarum	60	50	60	70	40	50

V tabulce „L“ označuje levotočivý izomer kyseliny mléčné a „D“ její pravotočivý izomer.

- 25 Reaktor 4 odpovídá horní části tlustého střeva, reaktor 5 střední části a reaktor 6 dolní části tlustého střeva. Zkoumání ukazuje, že kmen v modelu tlustého střeva vytváří kyselinu L–mléčnou.

C. Výzkum, jak kmen chrání střevní epitelální buňky před napadením Salmonella typhimurium

- 30 Střevní epitelální buňky typu CaCo–2 byly pěstovány *in vitro*. Potom k nim byla přidána kombinace laktobacilů a Salmonella typhimurium v poměru 100:1 a s 1 milionem salmonel na 1 mililitr. Účinek byl studován po inkubaci 120 minut při 37 °C. Množství napadajících salmonel bylo určeno po trojnásobném promytí ploten s narostlými buňkami CaCo–2. Narostlé buňky byly ošetřeny antibiotikem gentamycinem o koncentraci 100 mg/l po dobu 1 h, aby byly usmrceny
35 všechny bakterie, které nevnikly do buněk. Potom byly plotny omyty pomocí PBS, aby se odstranil všechny gentamycin a nakonec byly zachycené bakterie uvolněny působením 0,1% Tritonu–X na buňky CaCo–2 za třepání. Počet salmonel byl potom určován běžným postupem vysévání na plotny. LMG P–17806 měl zřetelný vliv tím, že snižoval počet napadených buněk. Na druhé straně blízké příbuzná varianta paracasei 506 se zdála spíše stimulovat napadání salmonelovými bakteriemi. Také co se týká této vlastnosti, ukázal LMG P–17806 kladný účinek. Výsledky jsou ukázány dále v tabulce 4.
40

Tabulka 4

Napadení salmonelami

5

Laktobacily	% napadajících salmonel	
	bez laktobacilů	s laktobacily
LMG P-17806	2,5	0,75
L. paracasei K 506	2,5	7
L. plantarium	2	2
L. rhamnosus	2,5	0,75

Tabulka ukazuje, že kmen LMG P-17806 poskytuje zřetelnou ochranu proti napadení salmonelovými bakteriemi.

10

D. Výzkum ochrany proti *Helicobacter pylori*

Byl měřen účinek podávání fermentovaného mléčného výrobku na jedné straně s kmenem LMG P-17806, na druhé straně bez něho, na obsah *Helicobacter pylori* ve výkalech za použití myšího modelu, přičemž myši byly infikovány *H. pylori*.

15

Myši byly 3krát v jednodenních intervalech infikovány vždy 100 miliony bakterií kmene *H. pylori* 17874 ve šroubovicové formě. Potom byly myším podávány pokusné výrobky a obsah *H. pylori* ve výkalech byl měřen pomocí heparinizovaných magnetických kuliček a enzymatickým imunologickým testem. Byly testovány tři druhy výrobků. Ukázalo se, že všechny fermentované mléčné výrobky snižují podíl *H. pylori*, ale účinek nastával ve srovnání s běžným jogurtem a ve srovnání s kmenem *L. fermentum* KLD zřetelně rychleji v případech, když výrobek obsahoval LMG P-17806.

20

25

Tabulka 5

Obsah *H. pylori* ve výkalech měřený pomocí heparinizovaných magnetických kuliček a enzymatickým imunologickým testem

30

Výrobek	před užíváním	po dvoudenním užívání	po sedmidenním užívání	sedm dní po skončení užívání
běžný jogurt	1,48	1,86	0,63	2,25
jogurt s <i>L. fermentum</i>	1,65	1,62	0,94	1,61
jogurt s LMG P-17806	1,80	0,68	0,61	1,71

Čísla v tabulce vyjadřují absorbanci při 405 nm a jsou úměrná obsahu.

E. Testování vlivu kmene LMG P-17806 na imunologickou obranu

- Imunologický obranný systém je kontrolován řadou signálních sloučenin, tzv. cytokinů. Některé z nich mohou vyvolávat zánět. Vliv LMG P-17806 na tvorbu cytokinů TNF-alfa a IL-6 byl porovnáván s vlivem dvou druhů, obsažených v jogurtové kultuře, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Leukocyty byly odděleny z lidské krve a přidány v množství 10 milionů k živým bakteriím nebo k bakteriím zabitým pomocí glutaraldehydu. Jako kontrola byly použity lipopolysacharidy (LPS) z *E. coli*. Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce 6. Výsledky ukazují, že LMG P-17806 má v použitém modelu stejné zánětlivé vlastnosti jako běžný jogurt.

15 Tabulka 6

Vliv kmene LMG P-17806 na imunologickou obranu

Laktobacily	TNF-alfa mg/l		IL-6 mg/l	
	živé	mrtvé	živé	mrtvé
<i>S. thermophilus</i> , E584	12	1	0,4	<0,1
<i>L. bulgaricus</i> , E585	2	3	0,5	0,1
LMG P-17806	4	1	0,7	<0,1

20

F. Testování odolnosti kmene LMG P-17806 proti antibiotikům

- Probiotické přípravky mohou být užitečné v souvislosti s poruchami rovnováhy střevní flóry v průběhu léčení antibiotiky. Současně je důležité, že probiotické přípravky nepřispívají k šíření odolnosti proti antibiotikům, to je zvláště důležité při současném použití probiotických přípravků a antibiotik. Z tohoto důvodu byla stanovena odolnost kmene LMG P-17806 proti různým antibiotikům. Citlivost kmene LMG P-17806 k různým antibiotikům byla určována stanovením jejich koncentrace, při které bylo dosaženo 50% snížení růstu tohoto kmene, měřeno pomocí optické hustoty.

30

- Ukázalo se, že kmen LMG P-17806 byl odolný proti vankomycinu a nebyl inhibován ani při jeho koncentraci 256 mg/l. Kmen vykazoval nějakou odolnost proti trimethoprimu a cefotaximu, přičemž 50% optické hustoty (OD) bylo dosaženo při 12 mg/l, resp. 4 mg/l. Kmen LMG P-17806 byl na druhé straně citlivý k chloramfenikolu, erythromycinu, rifampicinu a tetracyklinu, kde již hladiny pod 1 mg/l měly za následek 50% inhibici růstu.

35

- Účinek antibiotik byl také zkoumán pomocí tzv. Sensi terčů od firmy Oxoid. Podle takto získaných výsledků je kmen LMG P-17806 odolný proti aztreonamu, ceftaximidu, cefoxitinu, síranu kolistinu, kanamycinu, polymyxinu B, streptomycinu a vankomycinu.

40

Kmen LMG P-17806 může být podle těchto výsledků zvláště zajímavý pro použití při současné terapii antibiotiky jako je vankomycin, trimethoprim a rovněž několik cefloxacinů, což jsou všechna antibiotika se známými místními účinky na střevní flóru a střevní funkce.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava bakteriálního koncentrátu

5

Zmrazený bakteriální koncentrát o koncentraci 10 miliard LMG P-17806 na gram byl připraven výše uvedeným způsobem pěstováním laktobacilů na syrovátkovém substrátu, ke kterému byl přidán 1 gram kvasničného extraktu na litr, při konstantním pH 5,5 po dobu 14 hodin při teplotě 36 °C. Bakterie byly odděleny pomocí centrifugace s průběžným promýváním centrifugátu. Koncentrát byl zmrazen v tekutém dusíku a potom do doby použití uložen při -80 °C.

10

Příklad 2: Příprava fermentovaného mléčného výrobku

15

Mléčný výrobek byl připraven z mléka postupem, který sestává z homogenizace mléka, tepelného opracování mléka po dobu 5 minut při teplotě +95 °C a ochlazení na +37 °C. Mléčný výrobek byl naočkován s 0,01 % komerčně dostupné, zmrazené jogurtové kultury a 0,5 % koncentrátu LMG P 17806. Kultury byly ponechány růst po dobu 6 hodin při uvedené teplotě. Mléko pak bylo sraženo a jeho pH sníženo na 4,55. Koagulovaná forma byla rozmělněna a výrobek ochlazen na +12 °C, po čemž byl balen do běžných plastických pohárů, které jsou normálně používány pro jogurt a nato ochlazen v chlazené komoře s teplotou +5 °C po dobu jednoho dne a noci. Jeho pH se snížilo na 4,4. Výrobek byl pak skladován při +8 °C po dobu až tří týdnů. Obsah kmene LMG P-17806 byl sledován a jak je vidět z výsledků uvedených dále v tabulce 7, nastával omezený růst kmene LMG P-17806 v kultuře a LMG P-17806 přežíval velmi dobře uskladnění po dobu tří týdnů při pH nižším než 4,4.

20

25

Tabulka 7

30

Skladovatelnost kmene LMG P-17806 v mléčném výrobku

Očkováno	Obsah v mléčném výrobku	Obsah po kultivaci	Po uložení 1 týden	Po uložení 2 týdny	Po uložení 3 týdny
9900	49	97	132	118	121

Obsahy jsou udány v milionech na gram.

35

Výrobek měl normální vzhled a sotva 1 % se oddělila ve formě syrovátky po čtrnáctidenním uskladnění. Výrobek měl výbornou chuť, stejnou konzistenci a čerstvou, jemnou vůni. Testovaný výrobek získal vyšší ohodnocení i než normální jogurt v nezávislém spotřebitelském průzkumu, provedeném výzkumným ústavem. Výrobek byl srovnáván ve spotřebitelském průzkumu s odpovídajícím výrobkem bez kmene LMG P-17806, přičemž hodnotící osoby nevěděly jaký výrobek byl ochutnáván. Výrobku s kmenem LMG P-17806 dávalo přednost 74 % testujících osob a získal průměrnou hodnotu 7,6 na devítibodové škále, což je významně vyšší než výsledky běžného jogurtu. Hodnocení bylo o něco více než o 1 bod vyšší než u dříve známé probiotické kultury s *Lactobacillus acidophilus*. Výsledky se také liší od výsledků, které byly dříve získány při porovnání mezi čistým jogurtem a výrobky, vzniklými smísením jogurtu a probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus* popřípadě *Bifidobacterium longum*. V těchto porovnáních nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi čistým jogurtem a uvedenými směsnými výrobky.

40

45

Příklad 3: Vhodné množství přidaného kmene LMG P-17806

Také byly provedeny pokusy o nalezení vhodného kvantitativního rozmezí pro přidávání kmene LMG P-17806. Mléko bylo zpracováno a přidána k němu jogurtová kultura tak, jak bylo popsáno výše, zatímco přidávání koncentráту kmene LMG P-17806 bylo měněno v rozsahu 5 % do 0,01 %. Při tak vysokém obsahu, jako bylo očkování 5 % LMG P-17806 byla získána příchut', která pravděpodobně pocházela ze složek samotné očkovací kultury. Avšak změna pH a vzhled výrobku byly normální. Obsah LMG P-17806 v čerstvém výrobku byl 504 milionů na gram a zůstal na této úrovni i v průběhu skladování. Při přidání 0,01 % koncentráту LMG P-17806 nebyl výrobek senzoričticky odlišitelný od běžného jogurtu a obsah LMG P-17806 byl již po jednotýden- ním skladování nižší než jeden milion na mililitr, což je nejnižší obsah, jaký musí výrobek obsa- hovat, aby mohl podle návrhu mezinárodní legislativy zůstat výrobkem, který obsahuje specifický probiotický přípravek.

Příklad 4: Příprava speciálního fermentovaného výrobku

Pokus byl proveden tak, jak bylo popsáno výše, s tou výjimkou, že k mléku bylo přidáno 0,4 g kvasničného extraktu na litr. Bylo očkováno s 0,01 % téže jogurtové kultury, jak bylo uvedeno výše, ale bylo přidáno pouze 0,1 % koncentráту LMG P-17806. Inkubace byla provedena po dobu 8 hodin při teplotě +34 °C, po níž byl proces přerušen a výrobek zchlazen, zabalen a ulo- žen, jak je uvedeno výše v příkladu 3. LMG P-17806 se za těchto podmínek namnožil 10krát a podobně jako výše bakterie v průběhu skladování dobře přežívaly. Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce.

Tabulka 8

Skladovatelnost specifického mléčného produktu kmene LMG P-17806

Očkováno	Obsah v mléčném výrobku	Obsah po kultivaci	Po uložení 1 týden	Po uložení 2 týdny	Po uložení 3 týdny
9900	10	103	114	109	107

Obsahy v tabulce jsou udány v milionech na gram výrobku.

Výrobek měl normální vzhled a asi 1,5 % se oddělilo ve formě syrovátky po čtrnáctidenním uskladnění. Výrobek měl dobré, ostré aroma a stejnoměrnou konzistenci.

Příklad 5: Příprava rostlinné šťávy obsahující kmen LMG P-17806

Rostlinná šťáva byla připravena smícháním mrkvového koncentráту a koncentráту pomerančové šťávy ve stejném poměru tak, že pH výsledné směsi bylo 3,9. Smíchaný nápoj byl tepelně opra- cován a bylo k němu přidáno 1 %, popřípadě 0,1 % koncentráту LMG P-17806. Obsah LMG P- 17806 tak byl 100 milionů na mililitr, popřípadě 10 milionů na mililitr. Nápoje byly uloženy při +7 °C po dobu 4 týdnů. Aroma výrobku nebylo ovlivněno a nebyl pozorován žádný vliv uložení nebo přidání LMG P-17806. Avšak přidání LMG P-17806 do koncentrace převyšující 50 milio- nů se však zdálo potlačovat snižování obsahu vitamínu C. Ve výrobku bez LMG P-17806, stejně jako ve výrobku s obsahem 10 milionů bakterií na mililitr, se obsah vitamínu C snížil z 25 mg/100 g před uložením na 18 mg/100 g po čtyřech týdnech. Při přidání 100 milionů LMG P-17806 na mililitr se obsah vitamínu C snížil pouze na 22 mg/100 g, tj. více než o 50 % nižší

pokles obsahu vitamínu C. LMG P-17806 dobře přežívá a obsah LMG P-17806 po čtyřech týdnech byl o 40 % nižší než v čerstvém výrobku, bez ohledu na přidané množství.

V jiném pokusu byl k témuž nápoji přidán LMG P-17806 v množství 5 %. To dodalo výrobku příchut', která se v průběhu doby uskladnění zhoršovala.

Příklad 6: Příprava prášku pro přípravu kaše

Prášek pro přípravu kaše je připraven běžným postupem. Koncentrát LMG P-17806, připravený jak je uvedeno výše, je lyofilizován po smíchání s kukuřičným škrobem a po zabalení, které zamezuje přístupu kyslíku, byl uložen při teplotě -20°C . Lyofilizovaný přípravek obsahoval 61 miliard LMG P-17806 na gram. Prášek pro přípravu kaše byl za sucha smíchán s 0,03 % LMG P-17806 a zabalen v dusíkové atmosféře do obalu, který zamezuje přístupu kyslíku. Prášek byl uložen zpočátku 3 měsíce při teplotě $+12^{\circ}\text{C}$ a potom další 4 měsíce při teplotě místnosti. Obsah LMG P-17806 je zřejmý z tabulky 9 uvedené dále. Prášek pro přípravu kaše poskytoval dobré možnosti pro přežití LMG P-17806 a proto je možné připravit například dětské potravinové výrobky s vysokým obsahem LMG P-17806.

Tabulka 9

Lyofilizovaný přípravek	Prášek před přidáním	Prášek po přidání	Po třech měsících	Po sedmi měsících
61 000	<0,0001	20	18	6,5

Obsahy ve výše uvedené tabulce jsou udány v milionech na gram prášku.

Prášek pro přípravu kaše byl rozpuštěn v 9 dílech vody o teplotě $+50^{\circ}\text{C}$ a byl určen obsah LMG P-17806. Obsah byl 1 milion LMG P-17806 na mililitr nápoje v případě, že byl použit prášek starý 6 měsíců. Kaši nebylo možno rozlišit od běžného výrobku. Po uložení v průběhu jedné noci při teplotě místnosti však kaše s přidaným LMG P-17806 chutnala slabě kyselé a měla pH 5,7.

V druhém pokusu byl zkoušen vliv přidání 1 % popřípadě 0,001 % lyofilizovaného přípravku LMG P-17806. Jeho obsahy v prášku po přidání byly 570 popřípadě 0,8 milionu na gram.

Prášky byly uloženy odpovídajícím způsobem a testovány po pětíměsíčním uložení. Po rozpuštění, jak bylo uvedeno výše, byl obsah v připravené kaši 800 milionů, popřípadě pro nízký přídavek méně než 10 000 na mililitr. Při vyšší koncentraci přídavku bylo pozorováno slabě kyselé aroma již po čtyřhodinovém uložení kaše při teplotě těla.

Příklad 7: Příprava suchého prášku pro použití jako „Zdravá výživa“

Lyofilizovaný koncentrát LMG P-17806 byl smíchán s různými množstvími kukuřičného škrobu v poměrech 1:1, 1:9, 1:99 a 1:999. Smíchané prášky byly uloženy v malých pytlíčcích v množství 1 až 100 gramů na pytlíček. Materiál pytlíčků byl nepropustný pro kyslík a vodní páru. Pytlíčky byly uloženy v mrazničce, ledničce nebo při teplotě místnosti. Obsah byl pak použit jako přísada do nápoje tak, že prášek byl smíchán s nápojem před jeho konzumací. Bylo zjištěno přežívání, které odpovídalo příkladu 6. Prášek připravený v poměru 1:1 byl také zabalen do želatinových kapslí v množství 0,4 gramu na kapsli. Počet bakterií v kapsli byl 10 miliard. Kapsle byly obaleny materiálem, který měl dobré izolační vlastnosti proti kyslíku a vodní páře. Kapsle byly uloženy

ny stejným způsobem, jak bylo uvedeno výše a byly získány výsledky, které odpovídají dobrému přežívání bakterií.

5 Příklad 8: Příprava a použití bakteriálních směsí

Kmen LMG P-17806 je možno míchat s jinými laktobacily, bez toho, že by docházelo k inhibici jejich růstu. Nezdá se, že by LMG P-17806 vytvářel jakékoli sloučeniny, které by inhibovaly jiné laktobacily nebo laktokoky, když je LMG P-17806 kultivován společně s jogurtovými kulturami, kulturami které kysnou mléko, obsahující laktokoky nebo jiné druhy laktobacilů, jako jsou *L. acidophilus*, *L. fermentum* nebo *L. rhamnosus*. Z výsledků pokusů se směsmi lyofilizovaných přípravků, obsahujících všechny tyto bakterie, vyplývaly nezměněné skladovací podmínky, ať bylo provedeno smíchání s kukuřičným škrobem nebo s práškem pro přípravu kaše. Po rozpuštění prášku a uložení po dobu 12 hodin při teplotě těla a 12 hodin při teplotě místnosti nebyl zjištěn žádný záporný vliv LMG P-17806 na celkový obsah laktobacilů nebo na obsah kterýchkoli bakterií.

V pokusu s přípravou probiotického kyselého mléka bylo k normálně zpracovanému mléčnému výrobku přidáno 0,5 % kultury která kysne mléko a 0,6 % lyofilizovaného koncentrátu jednotlivě každého z *L. acidophilus* NCFB 1748, *L. fermentum* KLD a LMG P-17806. Bylo však přidáno pouze 0,1 % KLD, protože vyšší přídavky měly za následek vznik příchutě a nechtěné sraženiny. Mléko bylo uloženo po dobu 19 hodin při teplotě místnosti. Pak bylo jeho pH 4,50. Mléko bylo ochlazené na +10 °C, zabaleno a uloženo při teplotě +6 °C až 14 dní. Výsledky jsou zřejmé z následující tabulky 10.

25

Tabulka 10

Mléčné bakterie	Před zchlazením	Po 5 dnech	Po 14 dnech
Laktokoky	730	810	580
<i>L. acidophilus</i>	135	142	131
<i>L. fermentum</i>	12	14	9
LMG P-17806	112	126	109

30

Obsahy jsou udány v milionech bakterií na mililitr.

Osmdesát zdravých pokusných osob dostalo k jídlu výrobky u příležitosti cesty na konferenci do Istanbulu v Turecku. Skupina byla rozdělena na dvě, jedna jedla kyselé mléko popsané výše pouze s LMG P-17806, zatímco druhá jedla probiotické kyselé mléko se třemi různými probiotickými kmeny. Testované osoby byly v místě konference 8 dní. Výrobky začaly jíst dva dny před odletem do místa konference a pokračovaly s jídlem ještě čtyři dny po návratu. Výrobky byly jedeny ve formě tří svačin rozložených rovnoměrně v průběhu dne, v množství 150 g/jídlo. Všechny pokusné osoby s výjimkou dvou osob ve skupině s kyselým mlékem uváděly, že jedly výrobek podle doporučeného schématu. V dotazníku byly žádány aby uvedly pomocí třístupňové stupnice potíže gastrointestinálního traktu, pokud jde o formy bolesti žaludku, tlaky, průjem nebo zácpu. Pokud se týká průjmů byl rozdíl vtom, že 5 % pokusných osob, které jedly pouze LMG P-17806 uváděly, že měly vážný nebo velmi vážný průjem v průběhu alespoň dvou dnů, zatímco tento výskyt byl 22 % ve skupině, která jedla probiotické kyselé mléko.

45

Zdá se tedy, že směs několika různých laktobacilů může být ještě účinnější, než pouze jeden kmen bakterií. To může být způsobeno skutečností, že podávané laktobacily měly různé vlastnosti.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, LMG P-17806, který je gram-pozitivní, homofermentativní, tyčinkovitá bakterie schopná produkovat kyselinu L-mléčnou a obsahuje tři plazmidy o velikosti 2,2, 4,36 a 9,1 tisíce bází, kde samostatně je kmen vhodný jako probiotický přípravek v potravě a jako přírodní lék, který je odolný in vitro ke kyselině chlorovodíkové a
10 žaludeční šťávě, snáší žlučové soli a přitom je nerozkládá, zatímco probíhá jejich silné vstřebávání, a který dobře přežívá průchod žaludkem a zažívacím traktem a který roste optimálně při 37 °C.
- 15 2. Kmen podle nároku 1, kde kmen obsahuje 44 % GC.
3. Kmen podle nároku 1 nebo 2, kde kmen byl izolován ze vzorků mikroflóry lidského zažívacího traktu.
4. Kmen podle nároků 1, 2 nebo 3, kde kmen fermentuje ribózu, adonitol, galaktózu, glukózu, fruktózu, manózu, sorbózu, manitol, sorbitol, N-acetyl-glukozamin, eskulin, celobiózu, maltózu, laktózu, sacharózu, trehalózu, inulin, melezitózu, D-turanózu a D-tagatózu.
- 20 5. Kmen podle nároků 1,2,3 nebo 4, kde kmen je dodán jako koncentrát ve formě zmrazeného nebo lyofilizovaného prášku.
- 25 6. Kmen podle kteréhokoli z předchozích nároků pro použití v potravě a/nebo jako přírodní léčivo, kde kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, je přidán k mléčnému výrobku, fermentovanému mléčnému výrobku, ovocnému nebo zeleninovému nápoji, jako je rostlinná šťáva, šťáva z citrusového ovoce nebo šťáva z jiného ovoce nebo zeleniny, v objemu mezi 0,001 % a
30 5 % vztaženo na potravu nebo přírodní léčivo, s výhodou 0,01 % a 1 % vztaženo na potravu nebo přírodní léčivo.
7. Kmen podle kteréhokoli z předchozích nároků 1 až 5 pro použití jako probiotický přípravek v potravě a/nebo jako přírodní léčivo, kde kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* je
35 kultivován společně s jogurtovými kulturami a kulturami, které kysnou mléko, s laktokoky nebo jinými druhy rodu *Lactobacillus*, jako jsou *L. acidophilus*, *L. fermentum* nebo *L. rhamnosus*.
8. Kmen podle nároku 6 nebo 7, kde kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* je přítomen v množství mezi 1 milionem až 10 000 miliony živých bakterií na gram kombinovaného
40 výrobku.
9. Výrobek obsahující kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že výrobek sestává z mléčného výrobku, fermentovaného mléčného výrobku, zeleninového nebo ovocného nápoje nebo prášku pro přípravu kaše,
45 kde všechny obsahují kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* v množství 5×10^5 až 5×10^9 , obvykle 1×10^5 až 10^9 živých bakterií na gram výrobku, což odpovídá 0,0005 až 0,5 % vztaženo na výrobek;
nebo koncentrovaného přírodního léčiva, kde kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* je
obsažen v množství 1000 až 100 000 milionů živých bakterií na gram výrobku, což odpovídá
50 0,001 až 100 % vztaženo na výrobek.
10. Výrobek podle nároku 9, obsahující stanovený počet bakterií, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že v případě potravinových výrobků dále obsahuje malý podíl, např. 0,001 až 0,1 % vztaženo na potravinový výrobek, kvasničného extraktu nebo jiné látky, která přispívá k růstu nebo přežívání

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* ve výrobku a v případě přírodních léčiv obsahuje látky důležité pro přežití bakterií anebo zbytky kultivačního substrátu.

- 5 **11.** Výrobek podle nároku 9 nebo 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* je poskytován jako koncentrát ve zmrzlém nebo lyofilizovaném stavu pro přímou spotřebu a to přimícháním k mléčnému výrobku, fermentovanému mléčnému výrobku, zeleninovému nebo ovocnému nápoji, k prášku pro přípravu kaše nebo do koncentrovaného přírodního léčiva.
- 10 **12.** Výrobek obsahující kmen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, pro použití jako potravinového výrobku a/nebo přírodního léku pro zmírnění atopických problémů u dětí, pro opravu změněné mikroflóry u starších lidí, která je způsobená normálními změnami vlivem věku nebo změněným vylučováním kyseliny chlorovodíkové, a pro normalizaci střevní flóry u lidí všeobecně, přičemž se obsah klostridiových bakterií snižuje, počet bifidobakterií se zvyšuje a vysoké počty koliformních bakterií se snižují.
- 15

20

Konec dokumentu
