РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG (11) 112923 A

(51) Int.Cl.
C 12 N 1/20 (2006.01)
A 23 L 33/135 (2006.001)

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21) Заявителски № 112923
(22) Заявено на 23.04.2019
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 10.2 на 2020

(56) Информационни източници:

(62) рег. №

(71) Заявител:
"ПРОВИОТИК" АД,
1618 София, бул. "Братя Бъкстон" 58

(72) Изобретатели:
Кирил Петков Петков;
Росица Василева Тропчева;
Петко Кирилов Петков;
Емануела Петрова Лукач;
Мартин Петров Драгулев;
Веселина Енчова Шишкова

(74) Представител по индустриална
собственост:
Камен Сашов Гогов
бул. "Цар Освободител" 10, ет. 3
София , 1000 , BG

(86) № на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИМИКРОБНИ КУЛТУРИ

(57) Настоящото изобретение е насочено към разработването на метод за размножаване на антимикробна култура. По-специално настоящото изобретение се отнася до метод за размножаване на антимикробна култура, включващ инкубиране при подходящи условия на жизнеспособен микроорганизъм в присъствието на микробен лизат, което позволява натрупването на антимикробни метаболити. Настоящото изобретение се отнася също така до размножена антимикробна култура и нейното използване като антимикробен агент.

25 претенции, 1 фигура

BG 112923 A

23-04-19

МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИМИКРОБНИ КУЛТУРИ

[1] Настоящото изобретение има за цел метод за размножаване на антимикробна култура. По-специално, настоящото изобретение се отнася за метод за размножаване на антимикробна култура, включващ инкубиране на жизнеспособен микроорганизъм в присъствието на микробен лизат при подходящи условия, който позволява натрупване на антимикробни метаболити. Настоящото изобретение се отнася също така за размножена антимикробна култура и нейната употреба като антимикробен агент.

УВОД

[2] Инфекциозните заболявания, включително и бактериалните инфекции, продължават да бъдат сериозен здравословен проблем в целия свят. Пробиотиците се дефинират като „живи микроорганизми, които, когато се прилагат в достатъчни количества, са полезни за здравето на приемника“. През последните няколко години прилагането на пробиотици при хората е обект на все по-голямо внимание, тъй като нараства броят на научните доказателства за свойствата на пробиотичните бактерии, тяхната функционалност и благоприятното им въздействие. Стремежът за намиране на повече нови пробиотици се обуславя от все по-голямото търсене на пробиотични функционални храни и напитки, както и на хранителни добавки поради все по-съзнателното отношения към здравето и нарастващата осведоменост на потребителите за здравето на червата и концепцията за превантивната грижа за здравето. Ние знаем, че някои от инфекциите и разстройства, като например синдромът на раздразнените черва, възпалителните заболявания на червата и антибиотик-асоциираната диария, са свързани с дефицити или компрометирана чревна микрофлора и се счита, че определени пробиотици имат благоприятен ефект за контролирането на такива разстройства.

[3] По-специално млечнокиселите бактерии, особено *Lactobacillus*, са най-често използваните микроорганизми като пробиотици – „Общопризнати за безопасни“ (GRAS). Киселинността, наличието на жлъчни соли, както и на панкреатични ензими в стомашно-чревния тракт (СЧТ) (GIT, от англ. GastroIntestinal Tract) са някои от основните стресове, с които орално приетите пробиотици се сблъскват в СЧТ. Освен че трябва да е в състояние да оцелява, един пробиотичен щам трябва да може и да се прикрепва към чревния тракт и след

това да го колонизира (поне временно). Тъй като СЧТ е динамична среда, потокът от храната, която се обработва в червата, може да отмие всяка бактерия, която не е прикрепена към чревната лигавица. Поради това е по-вероятно за колонизиране на СЧТ и за оказване на положителни въздействия по-голяма възможност да имат пробиотичните щамове, които притежават способността да се прикрепват.

[4] Интересът към използване на пробиотици в промишлеността нарасна драматично. Важно е, че тези пробиотици и съдържащите пробиотици продукти могат да се произвеждат в промишлен мащаб, възпроизводимо и без да се правят компромиси с благоприятните им ефекти.

[5] Различни методи за производство на пробиотици са описани и добре документирани. Някои от тези методи описват получаването на смесени микробни култури в течна хранителна среда. Голямо предизвикателство при производството на такива смесени култури е микробната конкуренция между различните популации в културалната среда. Един от начините за производство на смесени микробни култури е поотделното размножаване на различните щамове и комбинирането след това на размножените щамове в желаното съотношение. Това обаче е много трудоемко и скъпоструващо. Следователно продължава да съществува необходимостта от разработване на ефикасни и икономически ефективни методи за производство на антимикробни култури като например на пробиотици.

КРАТКО РЕЗЮМЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

[6] Авторите на изобретението са разработили метод за възпроизводимо получаване на антимикробна култура чрез размножаване на микроорганизъм в присъствието на микробен лизат.

[7] Съгласно един от аспектите методът от изобретението включва следните стъпки:

a. инокулиране на водна хранителна среда с инокулум, съдържащ микроорганизъм, с цел получаване на инокулирана среда, съдържаща около 10^2-$5x10^{10}$ жизнеспособни клетки/ml;
b. смесване на инокулираната среда с микробен лизат, за да се получи смес;
c. инкубиране на сместа при първата инкубационна температура (1Tc);
d. охлаждане на сместа от стъпка c. до втората инкубационна температура (2Tc), която е с най-малко около 0,5°C по-ниска от

първата инкубационна температура (1Tc) и инкубиране на охладената смес при 2Tc за получаване на размножена антимикробна култура; и опционално

e. събиране на размножената антимикробна култура.

[8] Методът съгласно настоящото изобретение позволява производство в индустриални или големи мащаби на размножена антимикробна култура.

[9] Съгласно един от аспектите методът съгласно изобретението включва следните стъпки:

f. Добавяне към получена чрез широкомащабно производство водна хранителна среда на размножена антимикробна култура съгласно претенция 1 като инокулум;

g. инкубиране на инокулираната среда при първата инкубационна температура (1Tc), за да се получи размножена антимикробна култура; и опционално

h. събиране на размножената антимикробна култура.

[10] Настоящият метод е напълно подходящ за производството на размножени антимикробни култури, които съдържат голям брой различни антимикробни метаболити.

[11] Освен това настоящият метод може да бъде прилаган, като се използват само материали за хранителни цели.

[12] Въпреки че авторите на изобретението не искат да се обвързват с теория, се счита, че методът съгласно настоящото изобретение се благоприятства от способността за комуникация (quorum sensing) между микроорганизми, и по-специално между бактериите, като например млечнокиселите бактерии.

[13] Авторите на настоящото изобретение са направили изненадващото и неочаквано наблюдение, че когато микробната култура е размножена съгласно метода на настоящото изобретение, размножените микроорганизми, и по-специално бактериите, като например млечнокиселите бактерии, отделят в резултат на метаболитния стрес, с който се сблъскват, повишено количество различни антимикробни метаболити. По-специално авторите на

настоящото изобретение са констатирали изненадващо и неочаквано, че когато микробната култура е размножена съгласно метода на настоящото изобретение, размножените микроорганизми, и по-специално бактериите, като например млечнокиселите бактерии, в резултат на комбинацията от метаболитен стрес, с който се сблъскват, и способностите на микроорганизмите за quorum sensing отделят максимално количество различни антимикробни метаболити.

[14] При някои варианти размножената антимикробна култура включва *Lactobacilli* и микробен лизат. При някои варианти размножените антимикробни *Lactobacilli* са *Lactobacillus delbrueckii*. При някои варианти размножените антимикробни *Lactobacilli* са *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. При някои варианти *Lactobacilli* са *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, щам GLB 44.

[15] Антимикробните метаболити могат да бъдат токсични по отношение на патогенни микроорганизми, като например бактериални патогени.

[16] При различни варианти размножената антимикробна култура е полезна за лечението на различни заболявания или състояния при хората, животните и растенията, като например микробни заболявания или състояния. При различни варианти размножената антимикробна култура е полезна за лечението на различни заболявания или състояния при хората, животните и растенията, като например бактериални заболявания или състояния.

[17] При някои варианти размножената антимикробна култура е полезна за лечението на заболявания или състояния, свързани с бактериални патогени, като например *E. coli* и *Helicobacter pylori*.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

[18] **ФИГ. 1** илюстрира антибактериалната активност на *L. bulgaricus* GLB44 по отношение на *H. pylori* – Зони на инхибиране като функция на ферментационното време.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

[19] Представен е метод за размножаване на антимикробна култура, при който инкубирането на микроорганизъм при подходящи условия в присъствието на оптимизирано количество микробен лизат води до повишени нива на антимикробни метаболити в размножената култура.

[20] В настоящото оповестяване различни публикации, патенти и публикувани описания на патенти са посочени чрез идентифициращи цитати. По този начин откритията в тези публикации, патенти и публикувани описания на патенти са включени чрез препратки в настоящото оповестяване, за да опишат по-пълно постиженията в областта, за която се отнася настоящото оповестяване.

[21] Съгласно един аспект се представя метод за размножаване на антимикробна култура, като методът обхваща следните стъпки:

a. инокулиране на водна растителна среда със съдържащ микроорганизъм инокулум за получаването на инокулирана среда, която съдържа около 10^2-5x10^{10} жизнеспособни клетки/ml;
b. смесване на инокулираната среда с микробен лизат за получаването на смес;
c. инкубиране на сместа при първата инкубационна температура (1Tc);
d. охлаждане на сместа съгласно стъпка c. до втора инкубационна температура (2Tc), която е най-малко с около 0,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc) и инкубиране на охладената смес при втората инкубационна температура за получаването на размножена антимикробна култура; и опционално
e. събиране на размножената антимикробна култура.

[22] Представен е също така метод за размножаване на антимикробна култура, като методът обхваща следните стъпки:

f. Добавяне към получена в рамките на широкомащабно производство водна хранителна среда размножена антимикробна култура съгласно претенция 1 като инокулум;

g. инкубиране на инокулираната среда при първата инкубационна температура (1Tc), за да се получи размножена антимикробна култура; и опционално

h. събиране на размножената антимикробна култура.

[23] В контекста на настоящия документ някои термини могат да имат следните дефинирани значения.

[24] В контекста на настоящия документ термините в единствено число с кратък и пълен член са синоними и могат да се използват взаимозаменяемо – „един/една/едно или повече“ („one or more") или „ най-малко един/една/едно“ („at least one“) – освен ако формулировката и/или контекстът не показват ясно друго. Например терминът „клетка“ („a cell“) означава както единична клетка, така и множество клетки, включително и смеси от тях.

[25] Използваният в английския текст термин „comprising“ означава включващ, съставен от, състоящ се от, съдържащ и представляващ.

[26] Всички цифри и числа, които са използвани в настоящия текст за означаване на количества, съотношения на материали, физически свойства на материали и/или употреба, трябва да се разбират като модифицирани или квалифицирани с термина „около“ („about“), освен ако изрично не е указано друго.

[27] Използваният в настоящия текст термин „около“ („about“) включва даденото число или числото и +/- 10% от даденото число или цифра. Като неограничаващ пример за това терминът „около десет (10) („about ten (10)“) ще обхваща от девет (9) до единадесет (11) или 9-11.

[28] Използваният в настоящия текст термин „антимикробен“ („antimicrobial“) се отнася за унищожаването или инхибирането на растежа на микроорганизми, и по-специално на патогенни микроорганизми, като например патогенни бактерии.

[29] Използваният в настоящия текст термин „размножаване на антимикробна култура“ (“propagating an antimicrobial culture“) означава метод за умножаване или повишаване на броя на микроорганизми, като например бактерии, чрез възпроизвеждане, растеж или пролиферация в предварително дефинирана културална среда, като например водна среда, при контролирани условия на инкубация. Условията на инкубацията варират при различните микроорганизми, което е известно на специалистите, и са адаптирани както е необходимо за осъществяване на методите съгласно настоящото изобретение.

[30] При някои варианти размножената антимикробна култура, получена по метода съгласно настоящото изобретение, се лиофилизира. При някои варианти размножената

антимикробна култура, получена по метода съгласно настоящото изобретение, се лиофилизира (freeze dried).

[31] При някои варианти инокулумът се лиофилизира.

[32] При някои варианти инокулумът се лиофилизира (freeze dried).

[33] При някои варианти размножената антимикробна култура, получена по метода съгласно настоящото изобретение, се събира за последваща обработка. При някои варианти събраната антимикробна култура се лиофилизира. При някои варианти събраната антимикробна култура се лиофилизира (freeze dried).

[34] При някои варианти инокулумът се събира за последваща обработка. При някои варианти събраният инокулум се лиофилизира (freeze dried).

[35] Терминът „водна среда“ („aqueous medium“), както е използван в настоящия текст, се отнася за приготвена от, с или с помощта на вода хранителна среда или среда за размножение, която подпомага растежа на микроорганизми.

[36] При някои варианти водната среда е инокулирана с микроорганизми. Използваният в настоящия текст термин „инокулиран“ (“inoculated”) се отнася за внасяне или добавяне към водната среда на микроорганизми, клетки, лизати или комбинации от тях.

[37] При някои варианти водната среда, използвана при настоящия метод, обикновено съдържа най-малко 70 wt.% вода. За предпочитане е водната културална среда да съдържа най-малко 80 wt.%, а най-добре е да съдържа 90 wt.% вода. Освен вода, водната културална среда съдържа източник на въглерод и азот, и опционално всички други съставки, които са необходии на организмите за растеж, като например соли, доставящи есенциални елементи, като например магнезий, фосфор и сяра.

[38] При някои варианти водната среда е животинско мляко или мляко от мандра. При някои варианти животинското мляко или млякото от мандра може да е получено от крава, овца, коза, камила, елен, бивол, як, кобила, магаре и т.н.

[39] При някои варианти водната среда е мляко от неживотински произход или мляко, което не е от мандра. При някои варианти млякото от неживотински произход или млякото, което не е от мандра, може да е получено от бадеми, соя, ориз, кашу, кокосов орех, овес, лен, коноп и т.н.

[40] При някои варианти водната среда до голяма степен е свободна от животински или мандраджийски продукти или животински странични продукти.

[41] Използваният в настоящия текст термин „животински продукти“ („animal products“) означава всеки материал, който е получен от тяло на животно. Животинските продукти включват мляко, яйца, мазнини, кръв, риба, ракообразни, черупчести морски животни и др. Използваният тук термин „животински страничен продукт“ („animal by-product”) е продукт, добит или произведен от животни, който е различен от мускулното месо.

[42] Използваният в настоящия текст термин „до голяма степен свободен“ („substantially free“) означава, че съдържанието е достатъчно ниско или пренебрежимо, така че при контакт на хората с описаните тук култури няма да възниква съществена опасност. При някои варианти водната среда е растителна среда.

[43] При някои варианти растителната среда може да бъде сок или екстракт от акай, агаве, бадеми, алое, ябълка, кайсия, рукола, авокадо, цвекло, чушка, къпини, синьо-зелени водорасли, боровинки, маркови, кайенска чушка, целина, чиа, кориандър, карамфил, кокосов орех, краставица, глухарче, фурми, копър, чесън, джинджифил, гинко, грейпфрут, гуаюса , коноп, чушки халапеньо, кълраво зеле, киви, лимон, лимонена трева, лайм, мака, мандарини, лук, портокал, магданоз, праскова, круша, ананас, малини, джоджен, спанак, спирулина, ягоди, сладки картофи, домати, корен на куркума, диня, млади пшеничени стръкове или растителната среда е соево мляко, оризово мляко, бадемово мляко, кафе, ленено масло, билков чай, или кленов сироп, или мед.

[44] При някои варианти растителната среда включва 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% от водната хранителна среда.

[45] При някои варианти водната среда е зеленчукова среда. При някои варианти зеленчуковата среда може да бъде сок или екстракт от морков, грах, обелки от домати, артишок, броколи, цветове на броколи, каперси, карфиол, аспержи, червено цвекло, канна, маниока, джинджифил, пащърнак, ямс или куркума.

[46] При някои варианти зеленчуковата среда включва 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% от водната хранителна среда.

[47] При някои варианти зеленчуковата среда включва 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% сок от моркови.

[48] При някои варианти водната хранителна среда включва комбинация от една или повече среди на растителна основа и една или повече среди зеленчукова основа вразлични съотношения.

[49] При някои варианти водната хранителна среда може да съдържа сок от моркови и сок от грах в съотношение около 50-50. При някои варианти водната среда може да бъде от екстракт от спирулина и сок от моркови в съотношение 50-50. При някои варианти водната хранителна среда може да бъде от екстракт от обелки от домати и сок от моркови в съотношение 50-50.

[50] При някои варианти водната среда е веганска среда. Използваният тук термин „веган“ („vegan“) означава, че тя не съдържа компоненти (като например месо, яйца или млечни продукти), които да са добити от животни или от животински продукти.

[51] Използваният в настоящия текст термин „инокулум“ („inoculum”) означава микробен материал или клетъчна култура, които се добавят към друг материал или друго вещество, като например водна хранителна среда. При някои варианти инокулумът включва живи или жизнеспособни микробни клетки. При някои варианти използваният в настоящият метод инокулум включва поне един микроорганизъм. Микроорганизмите, които могат да бъдат използвани, могат да включват прокариоти или еукариоти. Микроорганизмите могат да бъдат селектирани от вируси, бактерии или гъбички.

[52] За предпочитане е микроорганизмът да е селектиран от бактерии. Светът на бактериите се състои от над 70 000 вида и всеки един от тях има много различни характеристики. Пробите от микроорганизмите, които са размножавани с помощта на настоящия метод, могат да бъдат взети например от комплексни култури за ферментация на

храна за хора или животни, смесени култури за биозащита, комплексни пробиотици, микробиома.

[53] При някои варианти инокулумът съдържа около 10^2 до $5x10^{10}$ жизнеспособни клетки/ml или повече. Съгласно някои варианти инокулумът може да бъде получен с помощта на микрофлуидни системи.

[54] При някои варианти инокулумът, използван при настоящия метод, включва млечнокисели бактерии.

[55] Пробиотиците обикновено включват един от трите рода бактерии: *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* и *Streptococcus*. Във всеки един от тези три рода бактерии има множество видове.

[56] Родът *Lactobacillus* съдържа над 180 вида. При някои варианти *Lactobacilli* са от вида *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei* или *L. salivarius*.

[57] При някои варианти *Lactobacilli* са от вида *L. delbrueckii*. При някои варианти *Lactobacilli* са *Lactobacilli delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacilli delbrueckii lactis*, *Lactobacilli delbrueckii delbrueckii* или *Lactobacilli delbrueckii indicus*. При някои варианти *Lactobacilli* са *Lactobacilli delbrueckii bulgaricus*.

[58] При някои варианти микроорганизмът е *Lactobacillus plantarum* GLP3.

[59] При някои варианти микроорганизмът е *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, щам GLB 44.

[60] При някои варианти Lactobacilli са *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, щам GLB 44. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* GLB 44 са депозирани в Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури в София, България, на 17. април 2014 г., номер за достъп NBIMCC № 8814.

[61] Различните щамове на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* имат различна морфология. Например някои са прави, други са огънати, някои са единична клетка, други представляват двойка или линия от три. Следната дължина на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* GLB 44 е от около 14 μm до около 16 μm. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* GLB 44 често се среща и като къси вериги от две или три прави пръчици, които са слепени.

[62] При някои варианти *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* могат да се използват като бактерии в настоящото изобретение. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* се откриват в природата в България в четири различни растения: *Cornus mas* (обикновен дрян), *Galanthus nivalis* (обикновено кокиче), *Calendula officinalis* (невен) и *Prunus spinosa* (трънка).

[63] При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^{10}$ жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^9$ жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^8$ жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^7$ жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^6$ жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^2-$5x10^5$ жизнеспособни клетки/ml.

[64] При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^{10} жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^9 жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^8 жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^7 жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^6 жизнеспособни клетки/ml. При някои варианти инокулираната водна среда съдържа около 10^5 жизнеспособни клетки/ml.

[65] Специалистите знаят, че жизнеспособността на микробните клетки може да бъде оценена или определена чрез броя на образуващите колонии единици в милилитър (CFU/mL, от англ. colony-forming units), ако се изследва течност, или в грам (CFU/g), ако се изследва твърд материал.

[66] Ако размножената антимикробна култура е течна, концентрацията на жизнеспособните клетки може да бъде определена като брой на образуващите колонии единици в милилитър (CFU/mL или хранителна среда). При някои варианти концентрацията на жизнеспособните клетки в състава е от 0,5 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 0,5 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 125 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 100 милиона CFU/mL,

от 0,5 милиона до 75 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 50 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 10 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 5 милиона CFU/mL, от 0,5 милиона до 1 милион CFU/mL, от 1 милион до 1 милиард CFU/mL, от 1 милион до 500 милиона CFU/mL, от 1 милион до 400 милиона CFU/mL, от 1 милион до 300 милиона CFU/mL, от 1 милион до 200 милиона CFU/mL, от 1 милион до 150 милиона CFU/mL, от 1 милион до 125 милиона CFU/mL, от 1 милион до 100 милиона CFU/mL, от 1 милион до 75 милиона CFU/mL, от 1 милион до 50 милиона CFU/mL, от 1 милион до 10 милиона CFU/mL, от 1 милион до 5 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 5 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 200 милиона CFU/mL, от от 5 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 125 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 100 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 75 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 50 милиона CFU/mL, от 5 милиона до 10 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 10 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 125 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 100 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 75 милиона CFU/mL, от 10 милиона до 50 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 50 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 125 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 100 милиона CFU/mL, от 50 милиона до 75 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 100 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 100 милиона до 125 милиона CFU/mL, от 125 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 125 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 125 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 125 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 125 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 125 милиона до 150 милиона CFU/mL, от 150 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 150 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 150 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 150 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 150 милиона до 200 милиона CFU/mL, от 200 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 200 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 200 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 200 милиона до 300 милиона CFU/mL, от 300 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 300

милиона до 500 милиона CFU/mL, от 300 милиона до 400 милиона CFU/mL, от 400 милиона до 1 милиард CFU/mL, от 400 милиона до 500 милиона CFU/mL, от 500 милиона до 1 милиард CFU/mL или повече като например 10 милиарда CFU/ml.

[67] Ако размножената антимикробна култура е твърдо вещество, като например размножен антимикробен агент, концентрацията на жизнеспособните клетки може да бъде оценена чрез образуващите колонии единици в един грам (CFU/g). При някои варианти концентрацията на размножената антимикробна култура, като например размножен антимикробен агент, е от 0,5 милиона до 1 милиард CFU/g, от 0,5 милиона до 500 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 400 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 300 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 200 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 150 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 125 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 100 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 75 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 50 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 10 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 5 милиона CFU/g, от 0,5 милиона до 1 милион CFU/g, от 1 милион до 1 милиард CFU/g, от 1 милион до 500 милиона CFU/g, от 1 милион до 400 милиона CFU/g, от 1 милион до 300 милиона CFU/g, от 1 милион до 200 милиона CFU/g, от 1 милион до 150 милиона CFU/g, от 1 милион до 125 милиона CFU/g, от 1 милион до 100 милиона CFU/g, от 1 милион до 75 милиона CFU/g, от 1 милион до 50 милиона CFU/g, от 1 милион до 10 милиона CFU/g, от 1 милион до 5 милиона CFU/g, 5 милиона до 1 милиард CFU/g, 5 милиона до 500 милиона CFU/g, 5 милиона до 400 милиона CFU/g, 5 милиона до 300 милиона CFU/g, 5 милиона до 200 милиона CFU/g, 5 милиона до 150 милиона CFU/g, 5 милиона до 125 милиона CFU/g, 5 милиона до 100 милиона CFU/g, 5 милиона до 75 милиона CFU/g, 5 милиона до 50 милиона CFU/g, 5 милиона до 10 милиона CFU/g, от 10 милиона до 1 милиард CFU/g, от 10 милиона до 500 милиона CFU/g, от 10 милиона до 400 милиона CFU/g, от 10 милиона до 300 милиона CFU/g, от 10 милиона до 200 милиона CFU/g, от 10 милиона до 150 милиона CFU/g, от 10 милиона до 125 милиона CFU/g, от 10 милиона до 100 милиона CFU/g, от 10 милиона до 75 милиона CFU/g, от 10 милиона до 50 милиона CFU/g, от 50 милиона до 1 милиард CFU/g, от 50 милиона до 500 милиона CFU/g, от 50 милиона до 400 милиона CFU/g, от 50 милиона до 300 милиона CFU/g, от 50 милиона до 200 милиона CFU/g, от 50 милиона до 150 милиона CFU/g, от 50 милиона до 125 милиона CFU/g, от 50 милиона до 100 милиона CFU/g, от 50 милиона до 75 милиона CFU/g, от 100 милиона до 1 милиард CFU/g, от 100 милиона до 500 милиона CFU/g, от 100 милиона до 400 милиона CFU/g, от 100 милиона до 300 милиона

CFU/g, от 100 милиона до 200 милиона CFU/g, от 100 милиона до 150 милиона CFU/g, от 100 милиона до 125 милиона CFU/g, от 125 милиона до 1 милиард CFU/g, от 125 милиона до 500 милиона CFU/g, от 125 милиона до 400 милиона CFU/g, от 125 милиона до 300 милиона CFU/g, от 125 милиона до 200 милиона CFU/g, от 125 милиона до 150 милиона CFU/g, 150 милиона до 1 милиард CFU/g, от 150 милиона до 500 милиона CFU/g, от 150 милиона до 400 милиона CFU/g, от 150 милиона до 300 милиона CFU/g, от 150 милиона до 200 милиона CFU/g, от 200 милиона до 1 милиард CFU/g, от 200 милиона до 500 милиона CFU/g, от 200 милиона до 400 милиона CFU/g, от 200 милиона до 300 милиона CFU/g, 300 милиона до 1 милирад CFU/g, 300 милиона до 500 милиона CFU/g, 300 милиона до 400 милиона CFU/g, 400 милиона до 1 милиард CFU/g, 400 милиона до 500 милиона CFU/g, or 500 милиона до 1 милиард CFU/g или повече като например 10 милиарда CFU/ml.

Микробен лизат

[68] Използваният в настоящия текст термин „микробен лизат“ („microorganism lysate") или „лизат“ („lysate") означава смес от микробни антигени, пептиди или метаболити, получени от различни инактивирани, увредени или разрушени микроби. Антигените, пептидите или метаболитите са получени чрез химичен или механичен лизис на микроорганизми и събирането на техния екстракт от култивираните микробни щамове. При някои варианти микробният лизат, използван при настоящия метод, се получава от най-малко един микроорганизъм. Микробният лизат, който може да бъде използван, може да съдържа прокариоти или еукариоти. Микробният лизат може да бъде получен от вируси, бактерии или гъбички. При някои варианти лизатът е поучен от бактерии. При някои варианти лизатът е получен от млечнокисели бактерии.

[69] При някои варианти лизатът е получен от млечнокиселите бактерии, които принадлежат към рода *Lactobacillus*. При някои варианти лизатът е получен от *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii, L. fermentum, L. helveticus, L. plantarum, L. reuteri, L. sakei* или *L. salivarius*.

[70] При някои варианти лизатът е получен от *L. delbrueckii*. При някои варианти лизатът е получен от *Lactobacilli delbrueckii bulgaricus, Lactobacilli delbrueckii lactis, Lactobacilli delbrueckii delbrueckii* или *Lactobacilli delbrueckii indicus*. При някои варианти лизатът е получен от *Lactobacilli delbrueckii bulgaricus*.

[71] При някои варианти лизатът е получен от *Lactobacillus plantarum* GLP3.

[72] При някои варианти лизатът е получен от *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, щам GLB 44.

[73] При някои варианти микробният лизат съдържа около 0,1% v/v хранителна среда, за предпочитане около 0,2% хранителна среда, за предпочитане около 0,4% хранителна среда, за предпочитане около 0,8% хранителна среда, за предпочитане около 1% хранителна среда, за предпочитане около 1,2% хранителна среда, за предпочитане около 1,4% хранителна среда, за предпочитане около 1,8% хранителна среда, за предпочитане около 2% хранителна среда, за предпочитане около 3% хранителна среда, за предпочитане около 4% хранителна среда, за предпочитане около 5% хранителна среда, за предпочитане около 6% хранителна среда, за предпочитане около 7% хранителна среда, за предпочитане около 8% хранителна среда, за предпочитане около 9% хранителна среда, за предпочитане около 10% хранителна среда, за предпочитане около 11% хранителна среда, за предпочитане около 12% хранителна среда, за предпочитане около 13% хранителна среда, за предпочитане около 14% хранителна среда, за предпочитане около 15% хранителна среда или повече.

[74] При някои варианти микробният лизат съдържа около 2% хранителна среда.

[75] При някои варианти микробният лизат е получен от същия микроорганизъм, който е размножаван.

[76] При някои варианти микробният лизат е получен от микроорганизъм, който е различен от размножавания микроорганизъм. При някои варианти микробният лизат съдържа набор от лизати, получени от различни микроорганизми. При някои варианти микробният лизат представлява набор от различни микробни лизати, в който най-малко един от смесените микроорганизми е размножаван.

[77] Счита се, че добавянето на микробен лизат към водната хранителна среда допринася за освобождаването на антимикробни метаболити от размножените микроорганизми. Счита се, че добавянето на микробен лизат към водната хранителна среда засилва освобождаването на антимикробни метаболити от размножените микроорганизми.

Апаратура и системи за инкубиране

[78] С цел преодоляване на някои от ограниченията на съществуващите системи, например по отношение на скоростта на растеж на микроорганизмите и quorum-ефекта, описаните тук методи прилагат подходящо адаптирани апаратури и техники за инкубиране, които използват различни типове и форми на физически сили, като например псевдосили. Различните типове и форми на физическите сили, като например псевдосилите, могат да бъдат генерирани например в резултат на ротираща платформа, която води до засилена адвекция и хаотично смесване на микроорганизмите, например бактерии, включваща водна хранителна среда и лизат. При някои варианти газопропускливи мембрани покриват камерите за микробните култури (например микрофлуидни системи), в които са затворени културите, за да позволяват пасивна, но ефективна аерация на пробата, а по този начин и оптимално производство на антимикробни метаболити.

[79] Без да се обвързваме с теоретични предположения, в една ротираща платформена система за инкубиране може да се използва псевдосилата на Ойлер (която е перпендикулярна на центробежната псевдосила), за да се генерира турбулентен поток и да се осигури равномерно смесване, например в микрофлуидна камера на микрофлуидна система. Псевдосилите на Ойлер са инерчни сили, които възникват, когато една микрофлуидна система е подложена на цикли от еднопосочно въртене с положително и отрицателно ускорение. Смесването зависи от геометрията на камерата, положителното/отрицателното ускорение и ъгъла на завъртане (angular spin).

[80] За течните микробни култури, като например бактериалните култури, бързият и здравословен растеж зависи от различни фактори, включително от (1) аерацията, така че бактериите да имат достъп до пресен кислород за растежа си, (2) наличието на хранителни вещества, когато пробите са напълно смесени, за да се доставят хранителни вещества хомогенно в цялата култура, (3) свеждане до минимум на биофилмите и агрегатиге, когато разклащането и разбъркването предотвратява утаяването на бактериалната култура на дъното на камерата и образуването на биофилми или агрегати, които възпрепятстват възпроизводството и (4) оптимално взаимодействие на култивираните бактерии с метаболити или антигени от лизата, което води до повишена експресия на антимикробни метаболити от култивираните бактерии.

[81] Микрофлуидните системи с ниско число на Рейнолдс притежават режими на ламинарен поток, които се доминират по-скоро от вискозни, отколкото от инерчни сили. Така, без турбулентно размесване, микрофлуидните устройства трябва да разчитат или на пасивна молекулна дифузия, или на външни източници на енергия. При някои варианти микрофлуидната система ускорява растежа или размножаването на микробните култури в сравнение със същия микроорганизъм, когато е инкубиран при използването на стандартната лабораторна апаратура. При някои варианти скоростта на размножаване на микроорганизма може да бъде с около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% по-висока от скоростта на размножаване на същия микроорганизъм, когато е инкубиран при използването на стандартната лабораторна апаратура.

[82] При някои варианти антимикробната култура е размножавана с помощта на микрофлуидна система. При някои варианти инокулумът е получен с помощта на микрофлуидна система.

[83] При някои варианти методът разчита на размножаване на антимикробните култури в търговски или широкомащабни производствени мощности. При някои варианти методът може да разчита на ферментационни системи, състоящи се от големи ферментационни резервоари, биореактори или широкомащабни пречиствателни системи.

[84] Използваният в настоящия текст термин „широкомащабен“ (largescale) е синоним на „в промишлен мащаб“ (commercial scale) и означава около 5 до 500 L или по-голямо количество антимикробна култура.

Методи за инкубиране на микробна култура

[85] При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва при температура като например първата инкубационна температура (1Tc) или втората инкубационна температура (2Tc) в интервала от 20°C до 60°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва при температура в интервала от 30°C до 50°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва при температура в интервала между 35 и 39°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва за предпочитане при температура в интервала между

около 35,5 и 38,5°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва за предпочитане при температура в интервала между около 36 и 38°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва за предпочитане при температура в интервала между около 36,5 и 38,25°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва за предпочитане при температура в интервала между около 37 и 38°C. При някои варианти инкубирането на микробната култура се извършва при температура около 38°C.

[86] При някои варианти микробната смес се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) в продължение на най-малко около 30 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 45 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 1 час, за предпочитане в продължение на най-малко около 1,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 2 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 2,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 3 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 4 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 6 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 6,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 7 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 7,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 8 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 8,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 9 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 9,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 10 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 10,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 11 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 11,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 12 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 12,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 13 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 13,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 14 часа или по-дълго.

[87] При един вариант сместа се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) в продължение на 12 часа.

[88] Една от стъпките на описания тук метод включва охлаждане на микробна култура. При някои варианти охлаждането се извършва на микробна култура, инкубирана

при първата инкубационна температура (1Tc). При някои от предпочитаните варианти охлаждането се извършва на антимикробна култура, инкубирана при първата инкубационна температура (1Tc) съгласно стъпка c. на настоящия метод.

[89] Съгласно описания тук метод преди последващата инкубация се осъществява стъпка на охлаждане на микробната култура до втората инкубационна температура (2Tc). При някои варианти до втората инкубационна температура (2Tc) се охлажда микробна култура, която е била предварително инкубирана при първата инкубационна температура (1Tc), преди всякаква допълнителна инкубация при втората инкубационна температура (2Tc). При някои варианти до втората инкубационна температура (2Tc) се охлажда антимикробна култура, която е била инкубирана при първата инкубационна температура (1Tc), както е описано в точка c. от метода, преди последващо инкубиране при втората инкубационна температура (2Tc).

[90] Втората инкубационна температура (2Tc) е с 3°C-7°C по-ниска от първата инкубационна температура 1Tc. При някои варианти втората инкубационна температура 2Tc е с 3°C-7°C по-ниска от първата инкубационна температура 1Tc.

[91] При някои варианти втората инкубационна температура (2Tc) е с най-малко около 0,6°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 0,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,5°C по-ниска от първата инкубационна температура

(1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 7°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc) или повече.

[92] При някои варианти микробната смес се инкубира при 2Tc преди да се инкубира при 1Tc.

[93] При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на най-малко около 30 минути. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на най-малко 45 минути. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на най-малко 1 час. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на най-малко 1,5 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение наз 2 часа, за предпочитане около 2,5 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 3 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 3,5 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 4 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при

втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 4,5 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 5 часа. При някои варианти микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 5,5 часа или по-дълго.

[94] Съгласно предпочитан вариант микробната смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на 2 часа.

[95] Съгласно предпочитан вариант сместа на щама *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* GLB 44 се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) от около 38°C в продължение на около 12 часа и охладената смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) от около 33°C в продължение на около 2 часа.

Quorum sensing

[96] Без да се обвързваме с теоретични предположения, по принцип се счита, че quorum sensing (междуклетъчната сигнализация) представлява отговор на флуктуации в гъстотата на клетъчните популации. Quorum sensing-микроорганизмите, например бактерии, произвеждат и освобождават химични сигнални молекули, наречени автоиндуктори, чиято концентрация нараства като функция на гъстотата на клетките. Откриването на минималната прагова стимулираща концентрация на един автоиндуктор води до промяна в генната експресия. Микроорганизми като Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии използват комуникационни вериги за quorum sensing, за да регулират широк спектър от физиологични дейности. Тези процеси включват симбиоза, вирулентност, компетентност, конюгация, производство на антибиотици, подвижност, спорообразуване и образуване на биофилми. По принцип Грам-отрицателните бактерии използват като автоиндуктори хомосеринови лактони, а Грам-положителните бактерии използват за комуникацията обработени олигопептиди. В резултат на напредъка в областта напоследък беше установено, че комуникацията между клетките *чрез* автоиндукторите се осъществява както в рамките на бактериалните видове, така и между тях.

[97] Счита се, че когато микробната култура се размножи съгласно метода на настоящото изобретение, размножените микроорганизми и по-специално бактериите, като например млечнокиселите бактерии, поради метаболитния стрес, с който се сблъскват по време на размножаването, освобождават повишени нива на различни антимикробни

метаболити. По-специално, когато микробната култура се размножава съгласно метода на настоящото изобретение, размножените микроорганизми, и по-специално бактериите, като например млечнокиселите бактерии, поради комбинацията от метаболитен стрес и способността за quorum sensing освобождават високи нива на различни антимикробни метаболити.

[98] Излагането на микробни култури, като например култури на бактерии или на млечнокисели бактерии, на комбинация от стресови усовия на растеж, като например субоптимална инкубационна температура (2Tc) след инкубиране при оптималната температура (1Tc) и в присъствието на микробен лизат, може да доведе до максимизиране на на антимикробни метаболити от размножената антимикробна култура.

[99] При някои варианти излагането на микробни култури, като например култури на бактерии или на млечнокисели бактерии, на комбинация от стресови усовия на растеж, като например субоптимална инкубационна температура (2Tc) и в присъствието на микробен лизат, може да доведе до максимизиране на антимикробни метаболити от размножената антимикробна култура. При някои варианти размножената антимикробна култура може да бъде използвана за антимикробен инокулум за инокулиране на получена в рамките на широкомащабно производство водна хранителна среда.

[100] При някои варианти излагането на микробни култури, като например култури на бактерии или на млечнокисели бактерии, включващи получена в рамките на широкомащабно производство водна хранителна среда и антимикробен инокулум, на комбинация от стресови усовия на растеж, като например субоптимална инкубационна температура (2Tc) след инкубиране при оптималната температура (1Tc), може да доведе до максимизиране на антимикробни метаболити от размножената антимикробна култура.

[101] Както е известно на специалистите, когато нивата на антимикробните метаболити в антимикробните култури достигнат определена желана концентрация или количество, както е показано на **ФИГ. 1**, растежът или размножението на микробната култура трябва да бъдат значително намалени или напълно спрени. Съществуват различни методи за значително намаляване или спиране на растежа на микробните култури и те са добре известни на специалистите. Като пример за методи за значително намаляване или спиране на растежа на микробни култури, които обаче не изчерпват възможностите, могат

да бъдат дадени бързото охлаждане на размножената антимикробна култура, лиофилизацията (freeze drying) на размножената антимикробна култура и др.

[102] При някои варианти скоростта на растеж или на размножаване на микробната култура се намалява значително или спира, когато се достигне желаното ниво на антимикробни метаболити.

[103] Желаното ниво на антимикробни метаболити може да зависи от предпочитаните последващи употреби на антимикробната култура.

[104] При някои варианти желаното ниво на антимикробни метаболити е в пика на log-фазата.

[105] При някои варианти растежът или размножаването на антимикробната култура значително спада или спира след достигане на пика на log-фазата, както е показано на **ФИГ.1.**

[106] При някои варианти антимикробните метаболити могат да бъдат токсични по отношение на патогенни микроорганизми, като например бактериални патогени. Използваният в настоящия текст термин „токсичен“ („toxic) се отнася за токсин или друго микробно вещество или метаболит, които могат да индуцират имунен отговор, и по-специално производство на антитела.

[107] При различни варианти размножената антимикробна култура може да е полезна за лечението на причинени от микроорганизми, като например бактерии заболявания на бозайници, и по-специално на хора чрез инхибиране на бактериалната quorum sensing каскада и превръщайки патогена в авирулентен. Тези болести включват ендокардит, респираторни и белодробни инфекции (преимуществено при имунокомпрометирани пациенти), бактериемия, кожни състояния, вагинални инфекции, инфекции на дебелото черво и на централната нервна система, ушни инфекции, включително възпаление на външното ухо, очни инфекции, инфекции на кости и стави, инфекции на уринарния тракт, стомашно-чревни инфекции и инфекции на кожата, включително и инфекции на рани, пиодермия и атопичен дерматит, които всички могат да се провокират от *Helicobacter pylori* или *E. coli.*

Антимикробни култури и тяхната употреба

[108] Най-общо казано, настоящото изобретение предлага метод за получаване на размножени антимикробни култури, които могат да бъдат използвани за редуциране на вирулентността на бактериални патогени. За специалистите е ясно, че размножената антимикробна култура, получена съгласно настоящите методи, може да бъде използвана в широк набор от области, като например в екологията, промишлеността и медицината за предотвратяване и/или третиране на увреждания или заболявания, причинени от бактерии. При някои варианти размножената антимикробна култура, получена съгласно настоящите методи, може да бъде използвана за консервиране на месо, храна за човека и за животните, в козметиката като антимикробни средства за кожата, в нутрацевтици, хранителни добавки и лекарствени средства.

[109] При някои варианти размножената антимикробна култура може да бъде използвана като антимикробен агент.

[110] При някои варианти размножената антимикробна култура може да бъде използвана като антибактериален агент.

[111] При някои варианти антимикробният агент може да бъде използван за разтвори за локално почистване или третиране, като например дезинфектанти, детергенти, почистващи средства в домакинството и прах за пране под формата на спрей или течност за дисперсър. В предпочитаната форма тези разтвори могат да се прилагат върху прозорци, контейнери, подове, дрехи, повърхности в кухнята и банята, както и върху други повърхности при приготвяне на храни и за лична хигиена. Освен това размножената антимикробна култура може да бъде използвана като антибактериална съставка на средства за лична хигиена, тоалетни средства и козметика като например паста за зъби, вода за уста, сапуни, шампоани, душгелове, мази, кремове, лосиони, небулизатори, дезодорантии дезинфектанти, както и в разтвори за съхранение на контактни лещи, вода за уста, напитки и храна за животни.

[112] При някои варианти размножената антимикробна култура се лиофилизира. Използваният в настоящия текст термин „лиофилизиран“ („lyophilised“) означава консервиране на размножената антимикробна култура чрез бързо замразяване и отстраняване след това на леда във вакуум или чрез сублимация. При някои варианти лиофилизираната антимикробна култура се консервира за продължително съхранение. При

някои варианти лиофилизираната антимикробна култура включва жизнеспособни микробни клетки. При някои варианти лиофилизацията може да бъде използвана за изготвянето на отделни дози, които после да бъдат възстановени за инжектиране.

[113] При някои варианти лиофилизираната антимикробна култура е лиофилизиран антимикробен агент.

[114] При някои варианти лиофилизираната антимикробна култура е лиофилизиран антибактериален агент.

[115] При някои варианти е представена размножена антимикробна култура в комбинация с една или повече приемливи от фармацевтична гледна точка съставки. При някои варианти е представена размножена антимикробна култура в комбинация с един или повече приемливи от фармацевтична гледна точка ексципиенти или добавки.

[116] В настоящия контекст „приемлив от фармацевтична гледна точка ексципиент“ се отнася за инертно вещество, което се добавя към фармацевтична композиция с цел допълнително облекчаване на прилагането на размножената антимикробна култура, например на лиофилизирана култура. Примери за ексципиенти, без да се ограничаваме до тях, включват калциев карбонат, калциев фосфат, различни захари и типове скорбяла, производни на целулозата, желатин, растителни масла и полиетиленгликоли.

[117] При някои варианти фармацевтичните композиции съдържат антимикробен агент. При някои варианти фармацевтичните композиции включват антибактериален агент.

[118] Настоящото изобретение се отнася също така за състави, включително и фармацевтични състави, съдържащи терапевтично ефективно количество размножена антимикробна култура, например лиофилизирана култура, както е спомената тук. Както се използва в настоящия текст, размножена антимикробна култура, например лиофилизирана култура, ще бъде терапевтично ефикасна, ако е в състояние да окаже въздействие на концентрацията на таргетния микроорганизъм.

[119] Следователно една размножена антимикробна култура, например лиофилизирана култура или агент, ще бъде терапевтично ефикасна, ако е в състояние да окаже въздействие на концентрацията на таргетния микроорганизъм, където е в състояние да лекува или предотвратява предизвиквано от микроорганизъм заболяване, като например

предизвиквано от бактерии заболяване или разстройство при хора след като размножената антимикробна култура, например лиофилизирана култура, е била приложена върху тях. При някои варианти заболяването или разстройството са свързани с патоген. При някои варианти патогенът е серотип на *Salmonella Enterica*. При някои варианти патогенът е *Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Salmonella newport, Salmonella hadar, Salmonella oranienburg, Salmonella javiana, Salmonella saintpaul, Salmonella muenchen, Salmonella agona, Salmonella I monophasic, Salmonella montevideo* или *Salmonella paratyphi*. При някои варианти патогенът е *Salmonella typhimurium*. При някои варианти патогенът е *Salmonella enteritidis*.

[120] При някои варианти патогенът е *Bacillus cereus, Campylobacter jejuni, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Cryptosporidium parvum, Escherichia coli, Giardia lamblia, Hepatitis A, Listeria monocytogenes, Norwalk virus, Staphylococcus, Shingella, Toxoplasma gondii, Vibrio* или *Yersiniosis*.

[121] При някои варианти патогенът е *Helicobacter pylori*.

[122] При някои варианти патогенът е *Escherichia coli*.

[123] При друг вариант размножената антимикробна култура, например лиофилизирана култура съгласно настоящото изобретение, може да се прилага директно върху животни, за предпочитане върху бозайници, както и особено върху хора като антибиотик *per se*, като смес с друга или под формата на фармацевтични препарати, които позволяват ентерално или парентерално приложение и които като активна съставка съдържат ефективна доза от размножената антимикробна култура, например лиофилизирана култура, в допълнение към обичайни фармацевтични ексципиенти и добавки.

[124] Както беше споменато по-горе, освен размножена антимикробна култур,а културата може да съдържа и обичайни, обикновено инертни носещи материали, добавки или ексципиенти. Така, културата може да съдържа добавки или помощни вещества, които обикновено се използват в галенични лекарствени форми, например пълнители, разредители, дезинтегранти, свързващи вещества, лубриканти, омокрящи агенти, стабилизатори, емулсификатори, консерванти, подсладители, оцветители, ароматизанти, буферни вещества, освен това разтворители или подобряващи разтворимостта вещества, или вещества за постигане на депо ефект, както и соли за модифициране на осмотичното налягане, покрития за таблетки или антиоксиданти. Те също така могат да съдържат две или

повече култури, както и други активни лекарствени вещества, като например противовирусни, противогъбични вещества или антибиотици.

[125] Културите съгласно настоящото изобретение могат да се използват самостоятелно, в комбинация с други съединения съгласно това изобретение или в комбинация с други активни съединения, например с активни съставки, които са вече известни за лечението на споменатите по-горе заболявания, като в последния случай се наблюдава благоприятен адитивен ефект.

[126] В друг аспект настоящото изобретение предлага процес за производството на продукт, избран от хранителни продукти, напитки, храни, нутрацевтици и храна за животни, като процесът включва комбинирането на един или повече съставки с размножена антимикробна култура.

[127] При някои варианти продуктите от размножена антимикробна култура могат да съдържат инертни неорганични или органични ексципиенти.

[128] При някои варианти за производството на хапчета, таблетки, филмирани таблетки и твърди желатинови капсули могат да се използват например лактоза, царевично нишесте или негови производни, талк, стеаринова киселина и нейните соли и т.н. Ексципиенти за меки желатинови капсули и супозитории са например мазнини, восъци, полутвърди и течни полиоли, природни или втвърдени масла и т.н. Подходящи ексципиенти за производството на разтвори и сиропи са например вода, алкохол, захароза, инвертна захар, глюкоза, полиоли и т.н..

[129] Дозата може да варира в широки граници и трябва да се съобрази с индивидуалните условия във всеки отделен случай. За горните приложения подходящата доза ще варира в зависимост от начина на прилагане, конкретното състояние, което трябва да се третира, както и от желания ефект. По принцин обаче, задоволителни резултати се постигат при дневни дози от около 0,1 до 100 mg/kg телесно тегло на животните, за предпочитане от 1 до 50 mg/kg. Подходящи дозировки за по-големи бозайници, например за хора, са от порядъка на 10 mg до 3 g/дневно, приемани за удобство еднократно, разделени на дози за 2 до 4 приема на ден или под формата на депо препарати.

[130] По принцип дневна доза от приблизително 0,1 mg до 5000 mg, за предпочитане между 10 и 500 mg, е подходяща за бозайници и по-специално за хора при орално приложение, който е предпочитаният начин на прилагане съгласно изобретението. В случая на други начини на прилагане дневната доза също е в подобни граници. Съединенията от формула I или формула II могат да бъдат използвани също така под формата на прекурсори на медикаменти или в подходящо модифицирана форма, която освобождава активната съставка *in vivo*.

[131] При друго приложение съединенията от настоящото изобретение могат да бъдат използвани като фармакологично активни компоненти или съставки на медицински устройства, инструменти и изделия с ефективна доза на размножена антимикробна култура, например лиофилизирана култура съгласно настоящото изобретение. Количеството на културите, използвани например за покриване на повърхностите на медицински устройства, варира до известна степен в зависимост от метода на нанасяне и областта на приложение. По принцип обаче, концентрацията варира от около 0,01 mg на cm^2 до около 100 mg на cm^2. Аналогично количеството на културите трябва да се съобрази с начина на приложение, ако културите съгласно изобретението се използват като компоненти или съставки на средства за почистване, разтвори за третиране или мази. По принцип ефективните дози са в интервала от около 0,1 μM до около 1000 mM.

Протоколи и обмен на данни

[132] При някои варианти методите и системите, оповестени в настоящия текст, включват освен това генерирането на един или повече протоколи. При някои варианти методите, оповестени в настоящия текст, включват съхраняването на един или повече протоколи. При някои варианти методите, оповестени в настоящия текст, включват обмен на един или повече протоколи. При някои варианти протоколът включва информация за способността на даден микроорганизъм да се размножава и да създава размножена антимикробна култура. При някои варианти протоколът съдържа препоръки за терапевтичния режим при използването на размножената антимикробна култура като антимикробен агент. При някои варианти протоколът съдържа препоръки за дозировката на размножена антимикробна култура при използването ѝ като антимикробен агент.

[133] За да стане разбираемо настоящото изобретение и да се приложи в практиката, някои варианти ще бъдат описани в настоящия текст с помощта на следните примери, които обаче не изчерпват възможностите.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ПРИМЕР

In vitro тест за антимикробна активност – ФИГ. 1

[134] Веганска хранителна среда: - 100% сок от моркови.

[135] Щамове на *Lactobacillus*, които са използвани при експериментите: 1. *Lactobacillus bulgaricus* GLB44; 2. Lactobacillus bulgaricus GLB3; 3. Lactobacillus bulgaricus GLB27

[136] Култивиране на *L. bulgaricus* GLB44 – Без максимизиране на антимикробните метаболити

[137] ***Приготвяне на инокулума: едностъпков процес***

[138] Култивиране на *L. bulgaricus* GLB44 във веганската хранителна среда при 38°C в продължение на 22 часа за достигане на експоненциалната фаза. Тогава използвайте само тази жива култура, за да инокулирате веганска среда за ферментация - 10% (v/v) в крайната среда за ферментация.

Ферментация и лиофилизация:

[139] Култивиране на *L. bulgaricus* GLB44 във веганската хранителна среда при постоянна температура 38°C в продължение на 24 часа в биореактор без аерация.

[140] Вземане на проби след 4-ия час на ферментацията, на всеки 2 часа. Неутрализация до pH=5,90 и лиофилизация на взетите проби от културата.

[141] Култивиране на *L. bulgaricus* GLB44, *L. bulgaricus* GLB3 и *L. bulgaricus* GLB27 - с максимизиране на антимикробните метаболити или разрастване на културата.

Получаване на инокулум от размножена антимикробна култура: двустъпков процес

[142] Първата стъпка от култивирането на инокулума продължава 12 часа при 38 градуса Целзий.

[143] Втората стъпка започва в 12-ия час, когато експоненциалната фаза е в своя пик, температурата се понижава от 38 на 33 градуса С за 2 часа, за да се създаде допълнителен стрес на бактериалната култура. Ултразвукова дезинтеграция на част от тази проба.

[144] След това се приготвя инокулационна смес (10% (v/v) от крайната смес за ферментация) - 8% GLB44 култура в експоненциалната фаза и 2% лизат от дезинтегрирани GLB44 клетки.

Ферментация и лиофилизация:

[145] Култивиране на щамовете на *L. bulgaricus* в биореактор без аерация на веганската хранителна среда в продължение на 12 часа при 38 градуса Целзий, след понижаване на температурата до 33°C за още 12 часа. Вземане на проби след 4-ия час на ферментацията, на всеки 2 часа. Неутрализация до pH=5,90 и лиофилизация на взетите проби от културата.

[146] Сравнително изследване на антимикробната активност на проби от *L. bulgaricus* по отношение на клиничен изолат от *H. Pylori.*

Проби от L. bulgaricus от всяка времева точка на изследвания ферментационен процес

[147] 1. *L. bulgaricus* GLB44 Без антимикробна максимизация: течна проба – възстановен лиофилизиран продукт (1:10, продукт:стерилен физиологичен разтвор)

[148] 2. *L. bulgaricus* GLB44 Антимикробна максимизация: течна проба – възстановен лиофилизиран продукт (1:10, продукт:стерилен физиологичен разтвор)

[149] 3. *L. bulgaricus* GLB3 Антимикробна максимизация: течна проба – възстановен лиофилизиран продукт (1:10, продукт:стерилен физиологичен разтвор)

[150] 4. *L. bulgaricus* GLB18 Антимикробна максимизация: течна проба – възстановен лиофилизиран продукт (1:10, продукт:стерилен физиологичен разтвор))

[151] ***Helicobacter pylori*** – клиничен изолат, култура в експоненциалната фаза на растеж.

Тестовият щам беше култивиран при анаеробни условия в хранителна среда за Brucella с 5% фетален телешки серум (B-FBS).

***Антибактериален тест in vitro*:**

[152] Тестът беше извършен по метода дифузия в агар с използване на ямки [Цитирана литература 1, 2]. Крайната концентрация на *Helicobacter pylori* в плочките от агар за Brucella с хемин, витамин K и 5% овча кръв (BMB) беше $3x10^5$ CFU/ml.

[153] Пробите от *L. bulgaricus* бяха приготвени както е описано по-горе и във всяка една ямка на блюдата на Петри бяха поставяни по 100 микролитра (μl) в 3 реплики (3x).

[154] Плочките агар бяха поставени в Gas-Pak буркани, съдържащи генериращи микроаерофилен газ пликчета, и бяха инкубирани при 37°C.

[155] Зоните на инхибиране бяха измерени след инкубиране в продължение на 120 часа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

[156] При нашите експерименти наблюдавахме, че когато един инокулум се максимизира с помощта на микробен лизат, като например дезактивирани бактерии и температурен шок, се наблюдава производството на неочаквано високи нива на различни антимикробни метаболити. Освен това наблюдавахме, че когато максимизираният инокулум се използва за инокулация на широкомащабна ферментация, втори температурен шок върху съответната ферментация води до неочаквано високи нива на различни антимикробни метаболити. Съответно наблюдаваните от нас ефекти са температурните шокове и натрупването на пептиди от инокулума в основната ферментация в резултат на quorum sensing. Заедно те водят до кумулативния ефект в основната ферментация. По същество считаме, че създаваме бактериоцин в инокулума, който после в резултат на quorum sensing създава по-високи нива на същия бацитрацин в широкомащабната или крайната ферментация.

[157] В етапа на крайната ферментация растежът или размножаването на микробите трябва да бъдат спрени в максимума, в противен случай нивата на антимикробните метаболити като бактериоцин спадат значително, тъй като размножаваните микроорганизми реабсорбират метаболитите и след това ги преработват като храна. Ясно се вижда от **ФИГ. 1**, че антимикробните нива започват да спадат след пика в log фазата. Чрез рязко охлаждане или замразяване на размножената антимикробна култура, когато антимикробните

метаболити са в пика, е възможно да се максимизират антимикробните нива в крайния разтвор/продукт.

* * *

[158] Илюстративно описаното тук оповестяване може съответно да бъде прилагано в практиката при отсъствието на какъвто и да е елемент или елементи, ограничение или ограничения, които не са специално оповестени тук. Така например термините „включващ" („comprising", „including"), „съдържащ" („containing") и т.н., трябва да се тълкуват в широк смисъл и без ограничения. Освен това термините и изразите бяха използвани в настоящия текст като термини за описание, а не за ограничаване и използването на такива термини и изрази няма за цел изключване на еквиваленти на характеристики, показани и описани или на части от тях, а се счита, че са възможни много варианти в обхвата на оповестяването.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА:

[1] S. Magaldi, S. Mata-Essayag, C. Hartung de Capriles, et al., Well diffusion for антifungal susceptibility testing, *Int. J. Infect. Dis.* **8** (2004) 39–45.

2] C. Valgas, S.M. De Souza, E.F.A. Smânia, et al., Screening методito determine антibacterial activity of natural products, Braz. *J. Microbiol.* **38** (2007) 369–380.

Attorney Ref: 9999/P001-SAR

ПРЕТЕНЦИИ

Претенции

1. Метод за размножаване на антимикробна култура, като методът включва следните стъпки:
    a. инокулиране на водна хранителна среда с инокулум, включващ микроорганизъм, за получаването на инокулирана среда, съдържаща около 10^2-5x10^{10} жизнеспособни клетки/ml;
    b. смесване на инокулираната среда с микробен лизат за получаването на смес;
    c. инкубиране на сместа при първата инкубационна температура (1Tc);
    d. охлаждане на сместа от точка c) до втората инкубационна температура (2Tc), която е с най-малко около 0,5°C по-ниска от първата инкубационна температура и инкубиране на охладената смес при 2Tc за получаването на размножена антимикробна култура; и опционално
    e. събиране на размножената антимикробна култура.

2. Метод за размножаване на антимикробна култура, като методът включва освен това следните стъпки:
    f. добавяне към получена чрез широкомащабно производство водна хранителна среда на размножена антимикробна култура съгласно претенция 1 като инокулум;
    g. инкубиране на инокулираната среда при първата инкубационна температура (1Tc), за да се получи размножена антимикробна култура; и опционално
    h. събиране на размножената антимикробна култура.

3. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от претенциите 1 или 2, където инокулумът е получен от микробиом.

4. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно претенция 3, където микроорганизмът е бактерия.

5. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно претенция 4, където бактерията е селектирана от млечнокиселите бактерии, *Bifidobacteria* или комбинации от тях.

6. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно претенция 5, където млечнокиселата бактерия е *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*.

7. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно претенция 6, където *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* е *Lactobacillus bulgaricus* GLB44.

8. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където лизатът е получен от микроорганизъм съгласно някоя от претенциите от 3 до 7.

9. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно претенция 8, където микробният лизат включва около 0,1% v/v хранителна среда, за предпочитане около 0,2% хранителна среда, за предпочитане около 0,4% хранителна среда, за предпочитане около 0,8% хранителна среда, за предпочитане около 1% хранителна среда, за предпочитане около 1,2% хранителна среда, за предпочитане около 1,4% хранителна среда, за предпочитане около 1,8% хранителна среда, за предпочитане около 2% хранителна среда, за предпочитане около 3% хранителна среда, за предпочитане около 4% хранителна среда, за предпочитане около 5% хранителна среда, за предпочитане около 6% хранителна среда, за предпочитане около 7% хранителна среда, за предпочитане около 8% хранителна среда, за предпочитане около 9% хранителна среда, за предпочитане около 10% хранителна среда, за предпочитане около 11% хранителна среда, за предпочитане около 12% хранителна среда, за предпочитане около 13% хранителна среда, за предпочитане около 14% хранителна среда, за предпочитане около 15% хранителна среда или повече.

10. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от претенциите 8 или 9, където микробният лизат съдържа около 2 % v/v хранителна среда.

11. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където първата инкубационна температура (1Tc) е в интервала между около 20°C до 60°C, за предпочитане между около 30°C до 50°C, за предпочитане между около 35-39°C, за предпочитане между около 35,5-38,5°C, за предпочитане между около 36-38°C, за предпочитане между около 36.5-38.25°C, за предпочитане между около 37-38°C, за предпочитане около 38°C.

12. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където първата инкубационна температура (1Tc) е около 38°C.

13. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където сместа се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) в продължение на най-малко около 30 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 45 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 1 час, за предпочитане в продължение на най-малко около 1,5 часа, за предпочитане в

продължение на най-малко около 2 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 2,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 3 часа, в продължение на най-малко около 4 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 6 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 6,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 7 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 7,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 8 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 8,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 9 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 9,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 10 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 10,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 11 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 11,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 12 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 12,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 13 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 13,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 14 часа или по-дълго.

14. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, при който сместа се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) в продължение на около 12 часа.

15. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където инкубираната смес от стъпка c) се охлажда до втората инкубационна температура (2Tc), която е с най-малко около 0,6°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 0,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 1,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 2,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 3,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за

предпочитане с най-малко около 4°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 4,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 5,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,25°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,5°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 6,75°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc), за предпочитане с най-малко около 7°C по-ниска от първата инкубационна температура (1Tc) или с повече.

16. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където охладената смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на най-малко около 30 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 45 минути, за предпочитане в продължение на най-малко около 1 час, за предпочитане в продължение на най-малко около 1,5 часа, за предпочитане в продължение на най-малко около 2 часа, за предпочитане около 2,5 часа, за предпочитане около 3 часа, за предпочитане около 3,5 часа, за предпочитане около 4 часа, за предпочитане около 4,5 часа, за предпочитане около 5 часа, за предпочитане около 5,5 часа или по-дълго.

17. Метод съгласно някоя от предходните претенции, където инокулираната среда съдържа около 10^9 жизнеспособни клетки/ml, за предпочитане около 10^8 жизнеспособни клетки/ml, за предпочитане 10^7 жизнеспособни клетки/ml, за предпочитане 10^6 жизнеспособни клетки/ml.

18. Метод за размножаване на антимикробна култура съгласно някоя от предходните претенции, където охладената смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) в продължение на около 2 часа.

19. Метод за размножаване an антимикробна култура съгласно претенция 7, където сместа се инкубира при първата инкубационна температура (1Tc) при около 38°C в продължение на около 12 часа и охладената смес се инкубира при втората инкубационна температура (2Tc) при около 33°C в продължение на около 2 часа.

20. Размножена антимикробна култура, получена по метод съгласно някоя от предходните претенции.

21. Размножена антимикробна култура съгласно претенция 20, като културата се лиофилизира.

22. Размножена антимикробна култура съгласно някоя от претенциите 20 или 21 за употреба като антимикробен агент.

23. Размножена антимикробна култура съгласно претенция 22 за употреба при третирането на *Helicobacter pylori*.

24. Размножена антимикробна култура съгласно претенция 22 за употреба при третирането на *E. coli*.

25. Процес за производството на продукт, избран от хранителни продукти, напитки, храни, нутрацевтици и храна за животни, като процесът включва комбиниране на една или повече съставки с размножена антимикробна култура, получена по метод съгласно някоя от претенциите 1 до 19.

ФИГ. 1 Антибактериална активност на *L. bulgaricus* GLB44 по отношение на *H. pylori* - Зони на инхибиране като функция на ферментационното време
(Проби *L. bulgaricus* GLB44 - неутрализирани до pH=5,90)

