

TN02000044/4-V3

PROBIOTICKÝ PŘÍPRAVEK

FORMULOVANÝ NA BÁZI

VEDLEJŠÍCH ZEMĚDĚLSKO-

POTRAVINÁŘSKÝCH SUROVIN

(FUNKČNÍ VZOREK)

T A
Č R

Projekt BIOCIRKL (TN02000044) je řešen s finanční podporou TA ČR.

POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

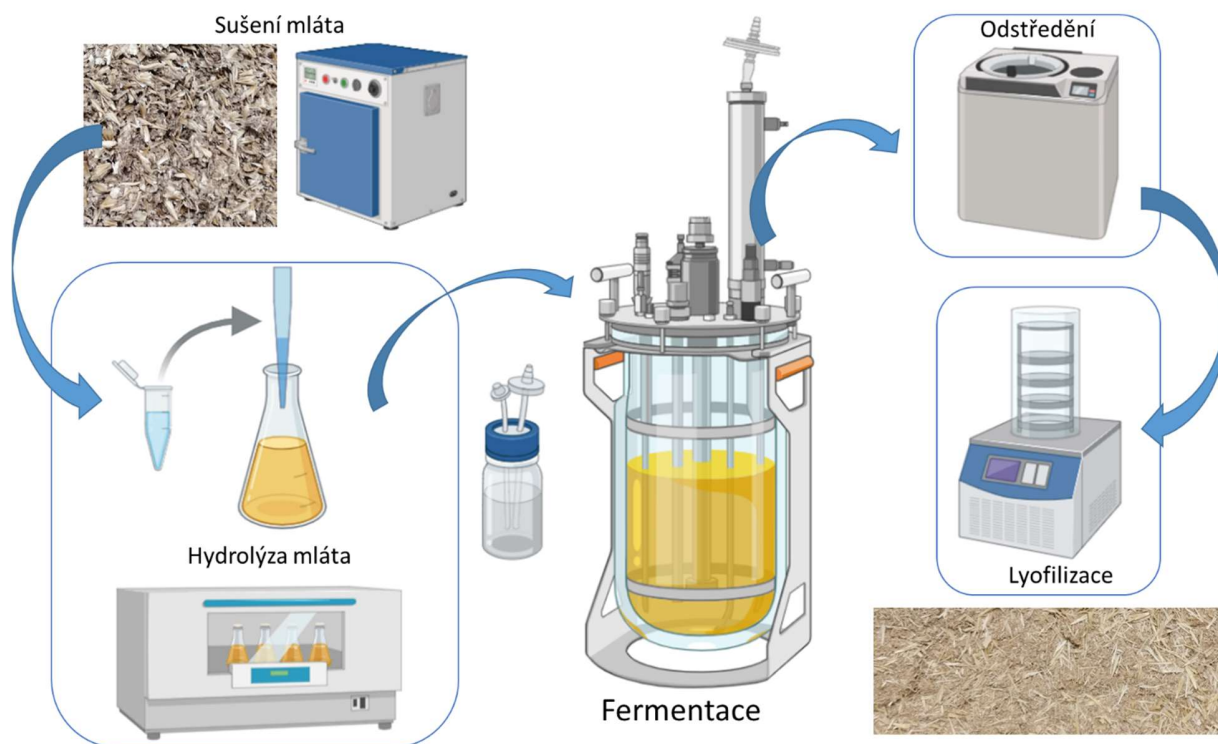
Funkční vzorek představuje probiotický přípravek vyrobený z vedlejších produktů pivovarské výroby obsahující spory probiotické bakterie *Clostridium butyricum*. Vybrané kmeny tohoto druhu vykazují prospěšné probiotické vlastnosti jak pro lidi, tak hospodářská zvířata a funkční vzorek by mohl spadat i do kategorie zootechnických doplňkových látek. Povolenu Novou potravinou je dle Prováděcího nařízení Komise (EU) 2017/2470¹ *Clostridium butyricum* CBM 588. Tato bakterie byla dále shledána jako bezpečná a prospěšná například pro kuřata, selata a krůty², nicméně v současné době je držitelem licence k uvádění na trh *C. butyricum* CBM 588 jediná firma³.

Funkční vzorek představuje biologický materiál vhodného složení, který byl vyroben novým postupem z vedlejších surovin potravinářské výroby, konkrétně mláta, postupem šetrné hydrolýzy a následné fermentace a s využitím látek povolených v potravinářských výrobcích. *Clostridium butyricum* je ve funkčním vzorku přítomno ve formě bakteriálních endospor (4×10^7) což umožňuje přežít podmínky trávicího traktu, efektivně působit ve střevě a zároveň ovlivnit stabilitu výrobku. Doprovodnými látkami jsou nerozložené zbytky mláta, které bylo využito jako substrát pro výživu probiotických bakterií. Funkční vzorek má podobu jemného prášku s drobnými zbytky mláta vláknité povahy, je hnědé barvy s charakteristickou vůní majoritního produktu fermentace, kyseliny máselné.

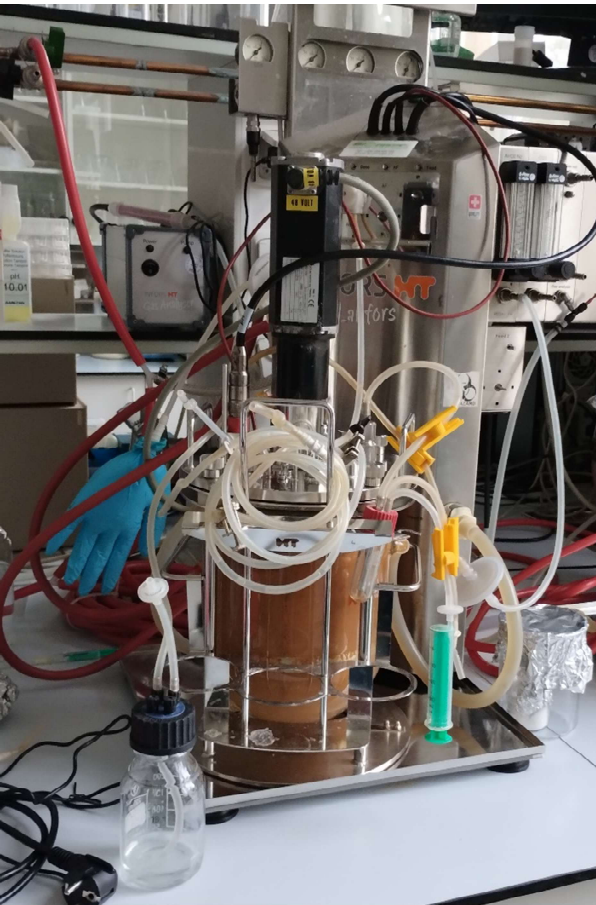
POPIS PŘÍPRAVY FUNKČNÍHO VZORKU

Mláto, představující zbytky po filtraci sladiny při výrobě piva (Univerzitní pivovar VŠCHT Praha) bylo nejprve vysušeno při 105°C k zajištění mikrobiologické stability. Suché mláto v poměru 10 % (w/v) bylo přelito roztokem 0,6% kyseliny sírové, který byl připraven z dále neupravované pitné vody z vodovodního řádu VŠCHT Praha. Směs byla umístěna do autoklávu a zahřáta na 121°C po dobu 20 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH 30% roztokem hydroxidu draselného na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ a přidán enzym Cellulase13L (Biocatalysts) v množství 1 ml na 1l hydrolyzátu a hydrolýza probíhala 40 h při 50°C a otáčkách 130 rpm na orbitální třepačce. Po ukončení hydrolýzy byl celý obsah, bez odstředění pevné fáze, převeden do bioreaktoru a spolu s reaktorem sterilován při 121°C 20 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH na hodnotu 6,5 pomocí 20% NaOH a přidán koncentrovaný roztok glukózy na celkovou koncentraci sacharidů 35 g/l k dosažení/dokončení sporulačního cyklu (původní koncentrace v hydrolyzátu byla stanovena na 27 g/l). Reaktor byl probublán plynným N₂ po dobu 15 minut při 1 VVM a na odvod fermentačních plynů byl umístěn plynotěsný vak. Čerstvě připravené inokulum ze sporové konzervy v časně fázi exponenciálního růstu (8 h od inokulace) bylo asepticky za anaerobních podmínek převedeno do reaktoru v objemovém poměru 1:8 a byla zahájena fermentace s řízenou úpravou pH na hodnotě 6,5 pomocí 20% NaOH. Otáčky míchadla byly nastaveny

na 200 rpm a teplota v reaktoru 37°C. Po 40 h byla kultivace ukončena, pevný podíl odstředěn (6000 rpm, 10 minut), lyofilizován a podroben analýze počtu spor a případné mikrobiální kontaminace. Ve vzorku bylo stanoveno 4×10^7 životaschopných spor a hmotnost produktu činila 56 % původní navážky suchého mláta.



Obr. 1: Zjednodušené schéma přípravy probiotického preparátu.





Obr. 2: Fotografie z jednotlivých kroků přípravy funkčního vzorku. Nahoře vlevo: suroviny, nahoře vpravo: příprava inokula, uprostřed vlevo: připravený fermentor s hydrolyzátem, uprostřed vpravo: fermentovaná směs po ukončení hlavní fermentace, dole vlevo vlhký pevný podíl, dole vpravo: konečný produkt.

PŘEDMĚT INOVACE

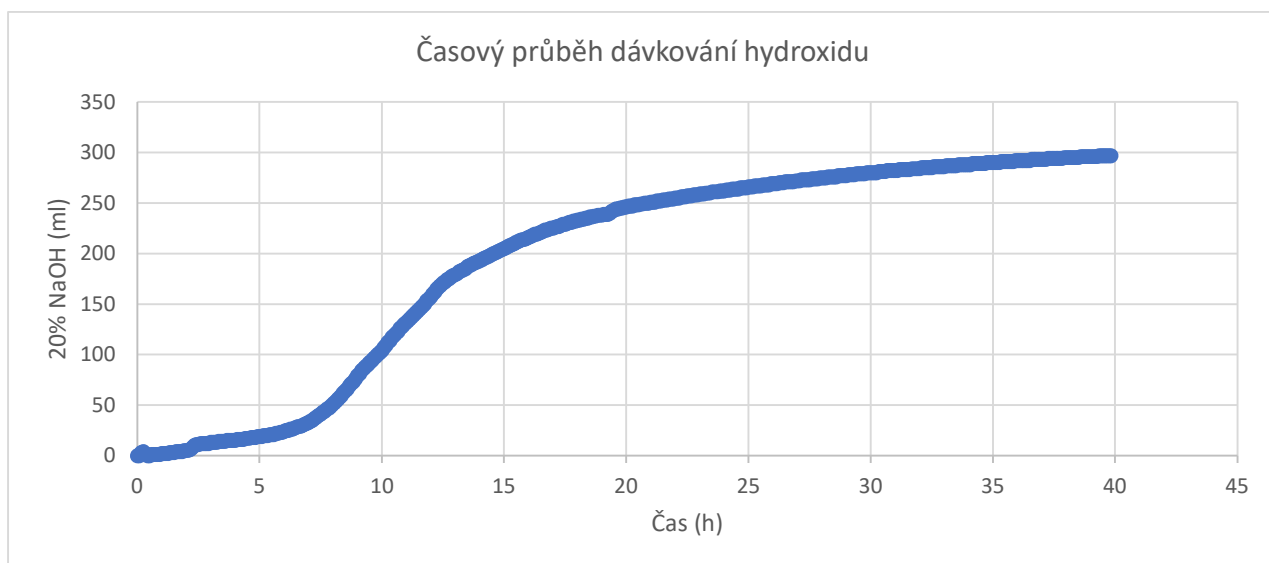
Probiotický přípravek je vyroben z odpadního pivovarského mláta:

- které není dále mechanicky upravováno,
- které po zvoleném způsobu hydrolýzy a inokulačního poměru obsahuje tolerované množství inhibitorů a umožňuje tak proliferaci bakterie bez aditivních kroků detoxifikace hydrolyzátu,
- které po zvoleném postupu hydrolýzy poskytuje veškeré potřebné živiny pro růst probiotické bakterie bez nutnosti přidavku dalších složek; sacharidy v minoritním množství jsou přidávány na základě analýzy konkrétní šarže hydrolyzátu v množstvím zaručujícím dokončení sporulačního cyklu (jedná se o energeticky náročný proces a při nedostatku sacharidů zůstávají bakterie ve své vegetativní formě).
- K inokulaci jsou využity bakterie ve specifické fázi růstu, kdy se díky intenzivní tvorbě plynů udržuje striktně anaerobní atmosféra během přečerpávání a zároveň jsou rychle nastaveny podmínky nízkého redoxního potenciálu v novém, částečně toxickém prostředí hydrolyzátu,

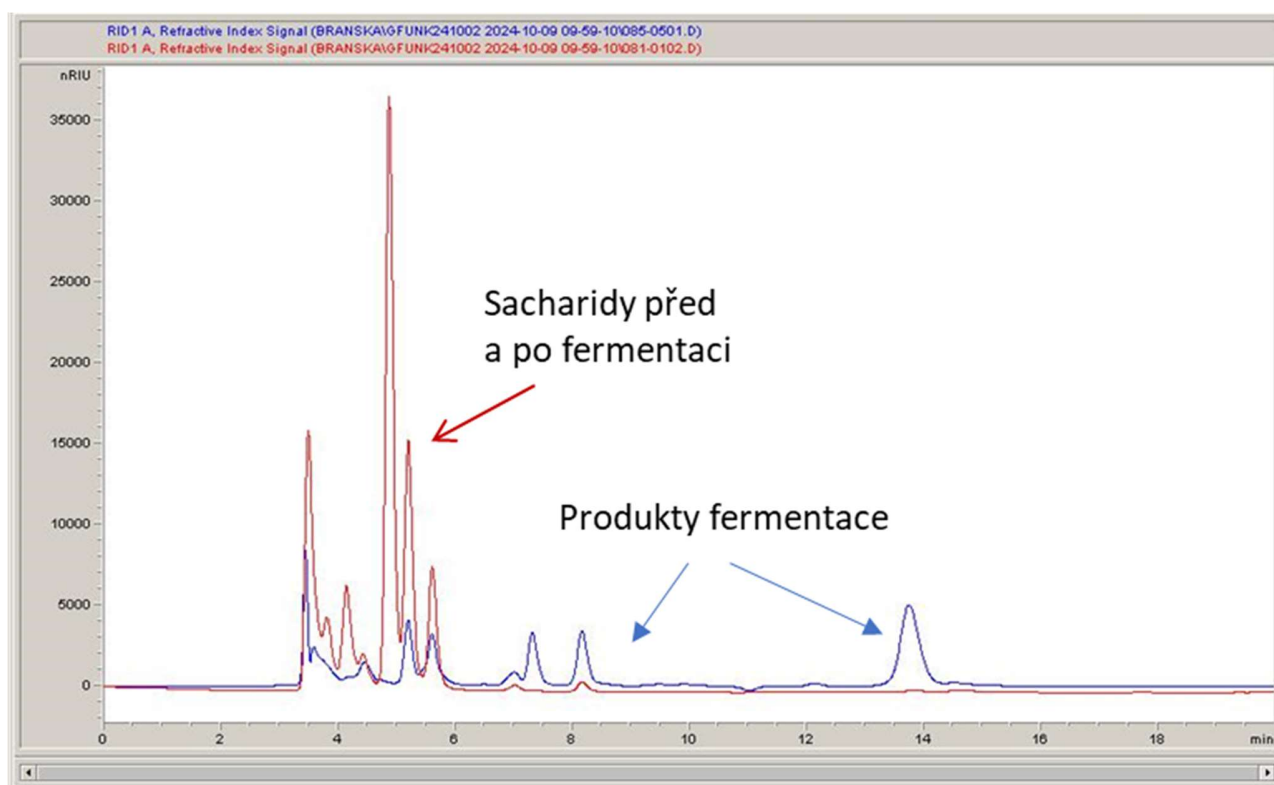
- k dosažení dostatečného nárůstu a dokončení sporulačního cyklu je využito regulace pH na hodnotu 6,5, která zabraňuje překyselení fermentačního média vlivem tvorby kyselin, které by vedlo k inaktivaci kultury ještě před zahájením sporulace,
- nehydrolyzované zbytky zůstávají součástí probiotického preparátu a není potřeba přidávat další plnidla, surovina je spotřebována beze zbytku.

ANALÝZA VSTUPŮ A VÝSTUPŮ:

Parametr			
Podíl sušiny v čerstvém mlátě	22,1 ± 0,3		
	Glukosa (g/l)	Xylosa (g/l)	Arabinosa (g/l)
Koncentrace sacharidů v hydrolyzátu	8,3 ± 0,6	11,9 ± 0,7	7,1 ± 0,4
Koncentrace sacharidů na začátku fermentace	18,5	9,4	5,9
Koncentrace sacharidů na konci fermentace	0,0	2,7	3,3
Spotřeba sacharidů	100 %	71 %	44 %
	Ferulová kyselina (mg/l)	Kumarová kyselina (mg/l)	Furfural (mg/l)
Koncentrace identifikovaných inhibitorů	19,8	5,5	x
	Koncentrace životaschopných spor	Životaschopné aerobní bakterie	Kvasinky a plísňe
Mikrobiologická kontrola	4 x 10 ⁷	< 10 ³ (0 KTJ v uvedeném ředění)	< 10 ² (0 KTJ v uvedeném ředění)



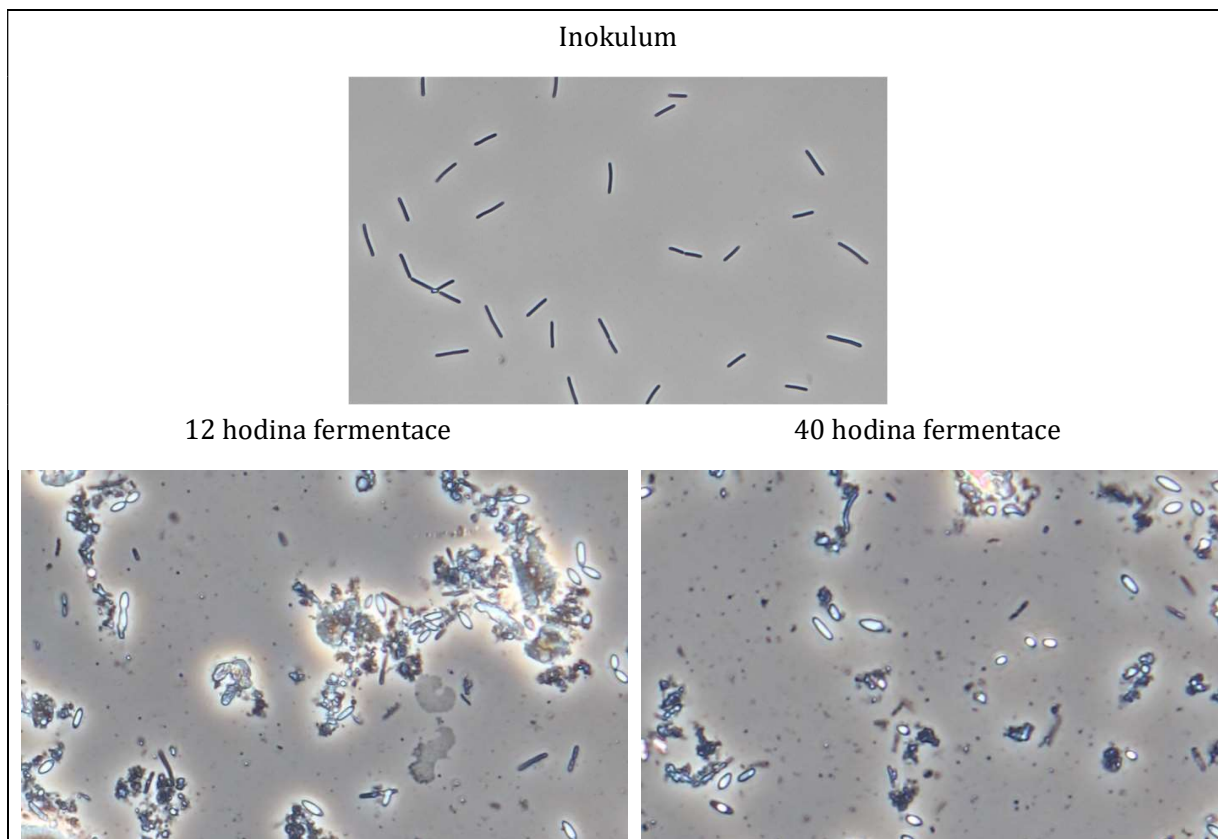
Obr. 3: Záznam průběhu fermentace: dávkování hydroxidu na neutralizaci vznikající kyseliny máselné a zároveň on-line kontrola aktivně probíhající fermentace.



Obr. 4: Chromatogramy kapaln  fáze před ( erven  křivka) a po fermentaci (modr  křivka) pro HPLC stanoven  sacharidů a organických kyselin.



Obr. 5: Chromatogramy kapalné fáze před (modrá křivka) a po fermentaci (zelená křivka) pro UHPLC stanovení inhibitorů z hydrolyzy.



Obr. 6: Mikroskopická kontrola inokula, průběhu fermentace (zduřelé buňky) a konce fermentace (kontrola přítomnosti spor).

ZÁVĚR

Odpadní pivovarské mláto tvoří největší podíl vedlejších produktů pivovarské výroby, ale je zároveň zajímavou surovinou pro následné využití. Ve zpracovávané surovině byl stanoven $46,0 \pm 0,1\%$ podíl uhlíku a $4,01 \pm 0,04 \%$ dusíku, které mohou po uvolnění z komplexních struktur sloužit k výživě mikroorganismů. Při tomto procesu hydrolýzy ale dochází k tvorbě řady inhibičních látek a bakterie rodu *Clostridium* jsou k jejich působení velmi citlivé. To se projevilo i v případě kultivace *C. butyricum*, která za většiny testovaných podmínek na připraveném hydrolyzátu nerostla. Výše uvedené podmínky, poměry a postup prací umožnily přípravu biologického vzorku s obsahem 4×10^7 /g životaschopných bakteriálních spor *Clostridium butyricum* s výtěžkem 56 % produktu na původní navážku sušeného mláta a to za podmínek minimálních přídavek dalších surovin. Zbytky nehydrolyzovaného mláta zároveň slouží jako plnidlo a nosný materiál a pevný podíl po fermentaci a vysušení tak tvoří kompletní produkt. Tento funkční vzorek bude dále využit k testování stability v různých podmínkách a testování možných forem zpracování (lisování do tablet, mísení s dalšími doplňky za účelem zlepšení senzorických charakteristik, úprava struktury mletím, apod.).

LITERATURA

1. Prováděcí nařízení Komise (EU) 2017/2470 ze dne 20. prosince 2017, kterým se zřizuje seznam Unie pro nové potraviny v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách.
2. Oka K, McCartney E, Ariyoshi T, et al. In vivo safety evaluation of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain in broilers, piglets, and turkeys. *Toxicology Research and Application*. 2019;3. doi:10.1177/2397847319826955
3. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 373/2011 ze dne 15. dubna 2011 o povolení přípravku *Clostridium butyricum* FERM-BP 2789 jako doplňkové látky pro menšinové druhy ptactva, s výjimkou nosnic, odstavená selata a menšinové druhy prasat (odstavených) a o změně nařízení (ES) č. 903/2009

Datum dokončení přípravy funkčního vzorku: 31. 10. 2024

Místo zpracování a uložení: Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6

Autoři výsledku:

doc. Ing. Barbora Branská, Ph.D., VŠCHT Praha

prof. Dr. Ing. Petra Patáková, VŠCHT Praha

Ing. Daniela Doubková, VŠCHT Praha

prof. Ing. Karel Melzoch, CSc, VŠCHT Praha

doc. Ing. Petr Kaštánek, Ph.D. EcoFuel Laboratories s.r.o.