

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 252

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A23L 31/00 (2016.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35344**

(22) Přihlášeno: **14.09.2018**

(47) Zapsáno: **29.10.2018**

(73) Majitel:
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
MycoTech s.r.o., Opava, Jaktař, CZ

(72) Původce:
RNDr. Petr Šimek, CSc., České Budějovice, České
Budějovice 7, CZ
Alexandr Jegorov, Dobrá Voda u Českých
Budějovic, CZ
RNDr. Josef Satke, Ph.D., Hradec nad Moravicí,
CZ
RNDr. Milan Stuchlík, Opava, Předměstí, CZ

(74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.
1847/5, 370 01 České Budějovice, České
Budějovice 3

(54) Název užitého vzoru:
Potravinový doplněk

CZ 32252 U1

Potravinový doplněk

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká oblasti výživy, konkrétně potravinového doplňku.

Dosavadní stav techniky

10

Beauverolidy jsou cyklické peptidy a jsou produkovány některými druhy vláknitých hub zahrnující rod *Paecilomyces* označované v poslední době také jako rod *Isaria*. Houby tohoto rodu, na rozdíl od jiných druhů hub jako je např. rod *Beauveria*, produkují ve velkém rozsahu jako sekundární metabolity s biologickým účinkem pouze tyto cyklické peptidy. Obdobné druhy hub produkující tyto biologicky aktivní látky jsou využívány v tradiční asijské, konkrétně čínské i korejské medicíně pro udržení duševní svěžesti a zpomalení procesu stárnutí. Návaznost na tradiční asijskou medicínu se projevuje ve snaze vědců izolovat jednotlivé beauverolidy a zkoumat jejich účinky. Podle publikované odborné literatury jsou beauverolidy orálně aktivní inhibitory acyltransferáz ACAT-1 a ACAT-2. Představují novou perspektivní skupinu látek s účinky proti kumulaci beta-amyloidních plaků během rozvoje Alzheimerovy choroby a s dalšími možnými terapeutickými účinky vhodnými při prevenci jiných neurodegenerativních onemocnění. Některé z těchto druhů jsou průmyslově využívány jako bioinsekticidy v biologické ochraně vhodných plodin před ekonomicky významnými hmyzími škůdci. Formulace přípravku entomopathogenní houby určené k hubení hmyzu přitom řeší problematiku jako např. zajištění vysokého obsahu infekčních spor nebo imobilizaci na levné nosiče vhodné pro venkovní rozprašování. Tento typ řešení často zahrnuje povrchovou kultivaci na jednoduchých zdrojích, jakými jsou např. obiloviny nebo anorganické nosiče napuštěné kultivačním médiem. Využití příbuzných druhů uvedených hub obsahujících beauverolidy jako hlavní bioaktivní látku nebylo dosud podle našich poznatků popsáno pro využití jako doplňku stravy.

30

Taxonomie těchto hub je dosud málo probádána, protože nejsou známa jejich perfektní stadia, a i v rámci těchto rodů existuje velká taxonomická diverzita. Je však známo, že perfektní stadia některých hub používaných v klasické čínské medicíně pro celkovou podporu zdraví, např. rody *Cordyceps*, kultivací *in vitro* poskytují výše zmíněné imperfektní formy. Beauverolidy jsou produkovány některými příbuznými druhy hub a prokazatelně vykazují účinky na nervovou soustavu, aniž je dosud přesně znám mechanismus jejich účinku. Situace je zde obdobná současnému stavu s poznatky o imunomodulačním působení hub, kde se ukazuje, že za tento imunostimulační účinek zodpovídají různé polysacharidy.

35

V některých historických asijských zemích, např. v Japonsku, jsou polysacharidy jako krestin neboli polysacharid-K uznávány jako léčiva. Perfektní stadia výše zmíněných hub se sbírají tradičně v Nepálu a na dalších hornatých územích ve střední Asii, což je zjevně málo dostupný zdroj.

40

Kultivace uvedených druhů hub je popsána v literatuře a patentech, např. v EP 1375639. Jejich cílem bylo především ovlivnění složení beauverolidů, jejich následná extrakce organickými rozpouštědly a izolace jednotlivých beauverolidů. Nevýhodou tohoto postupu je však obtížné a nákladné zpracování směsi přírodních beauverolidů. Beauverolidy mají příznivý podpůrný účinek na ochranu nervů před škodlivými vlivy, udržují duševní svěžest a zpomalují proces stárnutí. V tradiční asijské medicíně jsou beauverolidy používány v komplexu tak, jak jsou zastoupené v myceliu houby. Postup izolace jednotlivých beauverolidů je proto z technického hlediska málo efektivní. Obdobně je syntéza beauverolidů, zejména vzhledem výskytu unikátní chirální β -hydroxykyseliny ve struktuře, rovněž náročnou a nákladnou záležitostí.

50

55

Úkolem technického řešení je vytvoření takového potravinového doplňku, který by obsahoval beauverolidy, tedy by se jednalo o alternativní doplněk k původní tradiční asijské, zejména čínské medicíně, který by měl pozitivní účinky na zdraví uživatele, který by byl dostupný širokému spektru uživatelů, neboť jeho příprava by byla jednoduchá a ekonomicky výhodná.

Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí potravinového doplňku podle tohoto technického řešení, který řeší problematiku nového zdroje beauverolidů. Potravinový doplněk je ve formě pevné tablety nebo želatinové kapsle a podstata technického řešení spočívá v tom, že obsahuje tuhou samoemulgující disperzi tvořenou 30 až 50 % hmotn. sušeného dezintegrováného mycelia z alespoň jedné houby rodu *Isaria* nebo *Paecilomyces* a 30 až 40 % hmotn. monoacylglycerolů a 20 až 30 % hmotn. neionogenních tenzidů. Tuhá samoemulgující disperze obsahuje 0,99 až 1,65 % hmotn. beauverolidů. Samotné sušené dezintegrované mycelium obsahuje 3,2 až 3,4 % hmotn. beauverolidů, čímž je zajištěn vysoký obsah beauverolidů v jedné formě potravinového doplňku. Ve výhodném provedení je potravinový doplněk vytvořen ve formě dvoudílné želatinové kapsle nebo tobolky nebo lisované tablety.

Vysokého podílu beauverolidů v potravinovém doplňku je zajištěno kombinací dvou hlavních atributů, a to kultivací vybraných kmenů vláknitých hub rodů *Isaria* nebo *Paecilomyces* způsobem, kdy je dosahováno vysoké produkce beauverolidů a naopak minimalizována kontaminace mycelia komplexními složkami kultivačního media, a formulace izolovaného neživého mycelia houby do orálně použitelné formy potravinového doplňku bez jakékoli chemické úpravy, jako např. bez jakéhokoli použití organických rozpouštědel či jiné kontaminace přírodního materiálu.

Potravinový doplněk poskytuje nový zdroj beauverolidů a neobsahuje jiné nežádoucí bioaktivní látky, zejména beauvericin, a tak je komerčně realizovatelný jako doplněk stravy na nové kvalitativní úrovni, s návazností na původní poznatky vycházející z tradiční asijské, zejména čínské medicíny, a zaručuje vysoký obsah bioaktivních beauverolidů jako takových a čistotu produkce, tj. zejména zamezení možné kontaminace mycelia produkty pocházejícími z kultivačního media. Pro získání uvedených poznatků byly k tomuto účelu vybrány aplikaci testované druhy rodů *Isaria* nebo *Paecilomyces*. Druh *Isaria fumorosea* (*Paecilomyces fumoroseus* neboli PF) Apopka strain 97 je průmyslově využíván jako bioinsekticid v biologické ochraně vhodných plodin předekonomicky významnými hmyzími škůdci.

Protože jsou beauverolidy prakticky nerozpustné ve vodě, je třeba mycelium s obsahem této skupiny houbových metabolitů převést do biodostupné formy. Úprava biodostupnosti beauverolidů z houbového mycelia na samoemulgující disperzi se provádí jeho vpravením do nejvýše 65 °C teplé, roztavené směsi lipofilních monoacylglycerolů, majících glycerin v poloze 1 z nejméně 90 % substituován karboxylovou kyselinou o délce parafinového řetězce C11 až C17 a neionogenních tenzidů ze skupiny cukroesterů mastných kyselin o délce řetězce C11 až C17 s mono či disacharidy ve hmotnostních poměrech udílejících samoemulgující disperzi hydrofilně lipofilní rovnováhu v rozpětí 9 až 13 nejméně jednou pomocnou látkou upravující fyzikální vlastnosti. Takto vzniklá disperze snadno tavitelných emulgátorů s výslednou hodnotou hydrofilně lipofilní rovnováhy 9 až 13 s přídavkem mycelia vytvoří samoemulgující taveninu, která se vkládá do spodního dílu dvoudílných tobolky. Po vpravení do žaludku se spontánně ve střevní šťávě vytvoří emulze, umožňující ze suspendovaného mycelia, mechanismem micelární solubilizace, uvolnit beauverolidy do tělních tekutin.

Výběr dalších pomocných látek potřebných jednak k úpravě koncentrace beauverolidů v aplikačních formách tvořených dvoudílnými tobolkami a/nebo tabletami a také k úpravě zpracovatelnosti těchto kusových aplikačních forem vychází z parametrů samoemulgující

disperze mycelia a taveniny lipofilních emulgátorů, jako jsou mono a diglyceridy mastných kyselin s hydrofilních emulgátorů cukroesterů.

5 Beauverolidy představují stabilní cyklické struktury, které jsou podle našich poznatků stabilní v silně kyselém prostředí, 1 M HCl a v bazickém prostředí do pH = 8. Aplikace tobolek na myších prokázala, že beauverolidy se vstřebávají střešní stěnou a byly detekovány v krvi experimentálních zvířat. Beauverolidy prokazatelně vykazují účinky na nervovou soustavu, aniž je dosud přesně znám mechanismus jejich účinku. Situace je zde obdobná současnému stavu s poznatky o imunomodulačním působení hub, kde se ukazuje, že za tento imunostimulační
10 účinek zodpovídají různé polysacharidy.

Výhody potravinového doplňku podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že se jedná o alternativní doplněk k původní tradiční asijské, zejména čínské medicíně, má pozitivní účinky na zdraví uživatele, je dostupný širokému spektru uživatelů, neboť jeho příprava je
15 jednoduchá a ekonomicky výhodná.

Příklad uskutečnění technického řešení

20 Kultivace kmene vláknitých hub zahrnující rody *Isaria* nebo *Paecilomyces* se provádí povrchově nebo submerzně s použitím inokula z monosporického izolátu. Pro kultivaci hub byla testována různá media zahrnující a) zdroj cukrů, b) zdroj dusíku, c) anorganické minerální suplementy.

25 Jako zdroj cukrů je možné použít přednostně čisté mono a disacharidy, jednotlivě nebo obvykle v kombinaci více druhů sacharidů zajišťujících optimální růst houby. Aby se zamezilo kontaminaci mycelia, jsou přednostně využívány čisté monosacharidy jako např. sacharóza, glukóza, sorbit nebo jejich kombinace. Jako nevhodné zdroje lze označit škrob nebo kukuřičný extrakt, které mohou být sice levnější, ale mycelium kontaminují např. různými žlutými pigmenty.
30

Jako zdroj dusíku je možno použít anorganický dusík ve formě dusičnanů nebo lépe amonných solí. Alternativním zdrojem dusíku mohou být čisté aminokyseliny. Experimentálně bylo ověřeno, že optimálním zdrojem jak z hlediska růstu, produkce beauverolidů, tak z hlediska čistoty je nejvýhodnější použít hydrolyzát již předčištěné komodity, jako je např. kasein. Jako
35 nevhodné zdroje lze označit např. pepton, kde není zaručena reprodukovatelnost, mikrobiální čistota a může vyvolávat pochybnosti i např. z hlediska BSE kontaminace.

Typickými minerálními suplementy jsou amonné soli, fosfáty a některé mikroelementy jako sole vápníku, hořčíku a železa.
40

Kultivaci kmenů vláknitých hub zahrnující rody *Isaria* nebo *Paecilomyces* je možno provádět povrchově, např. technologií s využitím polyethylenových pytlů nebo submerzně v míchaných hloubkových fermentorech. Způsob kultivace nelimituje popis řešení tohoto technického řešení, pouze je využito takového způsobu, který umožňuje dosažení určité produkce beauverolidů
45 a zajišťuje čistotu produkovaného mycelia.

Produkováno mycelium je následně mechanicky odděleno od fermentační tekutiny, důkladně promyto vodou a vysušeno. Vlastní orální formulace potravinového doplňku vyžaduje dezintegraci a homogenizaci mycelia mletím na velikost částic vhodných pro formulaci. Orální
50 formulace se připravuje adjustací dezintegrováného mycelia do formy obvykle tvrdých želatinových kapslí spolu s plnivem. Toto řešení je upřednostňováno před přímou komprimací, která vyžaduje větší množství plniv zajišťujících kompaktnost tablet. Podle zamýšleného množství mycelia je možno volit želatinové kapsle různých tvarů a rozměrů podobným způsobem, jak jsou používány pro farmacii.
55

Potravinový doplněk je vytvořen ve formě tvrdých želatinových kapslí obsahujících sušené dezintegrované, jemně mleté mycelium houby vybraného druhu houby rodu *Paecilomyces*. Kmen musí produkovat beauverolidy jako hlavní sekundární metabolit bez dalších nežádoucích bioaktivních látek a pro přípravu mycelia je takový kmen kultivován na kaseinovém hydrolyzátu po dobu 3 týdnů. Mycelium je odděleno filtrací, důkladně promyto vodou a vysušeno. Obsah beauverolidů v myceliu je stanoven metodou kapalinové chromatografie pomocí referenční standardů beauverolidů, které byly izolovány v Biologickém centru AV ČR. Celkové množství zastoupených beauverolidů činí zpravidla 33 ± 1 mg na 1 g izolátu sušeného mycelia. Mycelium je následně dezintegrováno, jemně mleté a formulováno do dvou typů tvrdých želatinových kapslí.

Mycelium, které propadne sítem o délce straně oka 0,50 mm, má sypanou objemovou hmotnost 468 mg/ml a setřepnou objemovou hmotnost 624 mg/ml.

Příklad 1 - příprava samoemulgující disperze mycelia

a.	Mycelium PF	40,000 g
b.	Glyceryl monolaurát MONOMULS® 90 L-12	39,000 g
c.	Monolaurát sacharózy Ryoto Sugar Ester L-1695	21,000 g

Postup přípravy

Směs monoacylglycerolu v množství 39 % hmotn. a tenzidu v množství 21 % hmotn., tedy látek *b*, *c* v duplikátorové nádobě v celkovém množství 60 % hmotn. se o teplotě 65 °C roztaví za míchání do vzniku homogenní čiré kapaliny a po ochlazení na teplotu 50 °C se za stálého míchání přidá 40 % hmotn. mycelia, tedy látky *a*.

Po skončení ohřevu se pastovitá směs nechá ztuhnout na tuhou disperzi, která se pomele na prášek. Volně sypaná hmotnost 100 g samoemulgující disperze se 40 % hmotn. mycelia zaujímá objem 203,4 ml a setřepaná hmotnost zaujímá objem 179 ml.

Příklad 2 - příprava dvoudílných tobolek

Samoemulgující disperze mycelia připravená dle bodu 1 se setřepnou objemovou hmotností 559 mg/ml se vpraví do dvoudílných tobolek z želatiny, hydroxypropylmethylcelulózy a pullulanu.

Následující tabulka uvádí orientační rozsah množství beauverolidů při plnění samoemulgující disperze mycelia (propad sítem o délce straně oka 0,50 mm) bez jakýchkoliv pomocných látek, do běžných typů dvoudílných tobolek a obvyklých způsobů plnění práškových náplní.

Typ tobolky	Délka tobolky	Průměr tobolky	Objem spodního dílu tobolky	Ø obsah beauveriolidů v SE disperzi mycelia
1	19,0 mm	6,6 mm	0,50 ml	3,6 mg
0	21,2 mm	7,3 mm	0,70 ml	5,1 mg
00	23,3 mm	8,2 mm	0,90 ml	6,4 mg

Průmyslová využitelnost

Potravinový doplněk podle tohoto technického řešení lze využít zejména jako alternativu k doplňkům tradiční čínské medicíny s účinky proti kumulaci beta-amyloidních plaků během rozvoje Alzheimerovy choroby a s dalšími možnými terapeutickými účinky vhodnými při prevenci jiných neurodegenerativních onemocnění.

5

NÁROKY NA OCHRANU

1. Potravinový doplněk ve formě pevné tablety nebo želatinové kapsle, **vyznačující se tím**, že obsahuje tuhou samoemulgující disperzi tvořenou 30 až 50 % hmotn. sušeného dezintegrovaného mycelia z alespoň jedné houby rodu *Isaria* nebo *Paecilomyces* a 30 až 40 % hmotn. monoacylglycerolů a 20 až 30 % hmotn. neionogenních tenzidů, přičemž tuhá samoemulgující disperze obsahuje 0,99 až 1,65 % hmotn. beauverolidů.
- 10
2. Potravinový doplněk podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že monoacylglycerol je substituovaný v poloze 1 karboxylovou kyselinou s počtem uhlíků 11 až 17.
- 15
3. Potravinový doplněk podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že neionogenní tenzid je monoester mastných kyselin s počtem uhlíků 11 až 17 a disacharidu.
- 20
4. Potravinový doplněk podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že neionogenní tenzid je monolaurát sacharózy.
- 25
5. Potravinový doplněk podle nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že želatinová kapsle je dvoudílná a je tvořena hydroxypropylmethylcelulózou a pullulanem.