



(12) PATENT

(19) NO

(11) 326833

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20002919	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.12.08 PCT/SE98/02263
(22)	Inng.dag	2000.06.07	(85)	Videreføringsdag	2000.06.07
(24)	Løpedag	1998.12.08	(30)	Prioritet	1997.12.08, SE, 9704577
(41)	Alm.tilgj	2000.08.08			
(45)	Meddelt	2009.02.23			
(83)	Biol.mat. dep	BCCM P-17806			
(73)	Innehaver	Arla Foods AB, 10546 STOCKHOLM, SE			
(72)	Oppfinner	Torkel Wadström, Rektorsvagen 7, 22467 LUND, SE Per Aleljung, Lund, SE Ulla Svensson, Lund, SE Rangne Fonden, Stockholm, SE			
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO			

(54)	Benevnelse	Stamme av bakterier av arten <i>Lactobacillus paracasei</i> underart <i>paracasei</i>, preparat for anvendelse i næringsmidler og produkt inneholdende stammen
(56)	Anførte publikasjoner	HARTY et al; Pathogenic potential of Lactobacilli, International Journal of Food Microbiology, vol 24, nr 1/2, 1994, s 179-189 MERCENIER et al; Development of lactic acid bacteria as live vectors for orla or local vaccines, Adv. Food. Sci., vol 18, nr 3/4, 1996, s 73-77 THOREAUX et al; Modulation of Proliferation, Second Messenger Levels and Morphotype Expression of the Rat Intestinal Epithelial Cell Line IEC-6 by Fermented Milk, Journal of Dairy Science, vol 79, nr 1, 1994, s 179-189
(57)	Sammendrag	

Stamme av *Lactobacillus* anvendbar som probiotika i næringsmidler og naturopatiske medisiner og som in vitro er resistent mot saltsyre og magesafter og tolererer gallesalter uten dekonjugering derav mens sterk assimilasjon forekommer og som har god overlevelse ved passering gjennom magen og gastrointestinalkanalen og hvis stamme vokser optimalt ved omtrent 37 °C, hvis stamme er *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei*, som er en Gram-positiv homofermenterende, stavformet bakterie i stand til å produsere L-melkesyre og inneholdende tre plasmider med henholdsvis størrelse 2,2, 4,36 og 9,1 Kb. Oppfinnelsen vedrører også et preparat som inneholder stammen og et produkt som består av eller inneholder et konsentrat av stammen.

STAMME AV BAKTERIER AV ARTEN *LACTOBASSILLUS PARACEI* UNDERART *PARACASEI*, PREPARAT FOR ANVENDELSE I NÆRINGSMIDLER OG PRODUKT INNEHOLDENDE STAMMEN.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører en stamme av *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei*, et preparat derav for anvendelse i næringsmidler såvel som et produkt som inneholder nevnte stamme.

10 Definisjon og karakterisering av stammen

Den nye stammen (som i det etterfølgende for enkelhets skyld vil bli betegnet LMG P-17806) er en variant av arten *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei*. Den har

15 egenskapene til arten med et GC-innhold på 44 %. LMG P-17806 er blitt isolert fra prøver fra gastrointestinal-mikrofloraen i mennesker. LMG P-17806 har en Gram-positiv, homofermentativ stavformet bakterie. Den produserer L-melkesyre (venstredreieende stereoisomer av melkesyre) og vokser

20 optimalt ved 37 °C. Stammen er kjennetegnet ved at den er tolerant in vitro overfor saltsyre og magesaft ved å tolerere gallesalter uten dekonjugering derav og ved at den har stor evne til å assimilere kolesterol. Stammen er også kjennetegnet ved at den inneholder tre plasmider med størrelser på

25 henholdsvis 2,2, 4,36 og 9,1 Kb. Andre egenskaper er at stammen fermenterer ribose, adonitol, galaktose, glukose, fruktose, mannose, sorbose, mannitol, sorbitol, N-acetylglukosamin, esculin, cellobiose, maltose, laktose, sakkarose, trehalose, inulin, melezitose, D-turanose og D-tagatose. På

30 den annen side fermenterer den ikke glycerol, erytritol, D- og L-arabinose, D- og L-xylose, β -metyl-D-xylosid, rhamnose, dulcitol, inositol, α -metyl-D-mannosid, α -metyl-D-glukosid, amygdalin, arbutin, salicin, melibiose, raffinose, stivelse, glykogen, xylitol, gentiobiose, D-lyksose, D- og L-fukose, D-

35 og L-arabitol og 2- og 5-ketoglukonat.

Stammen er blitt kjennetegnet ved SDS gelelektroforese, hvor den er blitt sammenlignet med seks andre stammer av

Lactobasillus paracasei underart paracasei. I denne sammenligning er den blitt vist til å avvike fra alle andre beskrevne stammer og samtidig, når den sammenlignes med andre lactobacilli, synes den å tilhøre den designerte art. Den er
 5 også blitt karakterisert med hensyn til ribosom-RNA i en såkalt Riboprinter. Med denne metoden er stammen blitt vist til å ha 76 % likhet med typen stamme for Lactobasillus paracasei underart paracasei og 72 % likhet med typen stamme av Lactobasillus casei analysert ved den samme anledning.

10

Stammen er blitt deponert ved Belgian Coordinated Collections of Microorganisms - BCCM, LMG collection, og er blitt gitt deponeringsnr. LMG P-17806.

15 **Fordelene med stammen**

- LMG P-17806 har, sammenlignet med kjente stammer av Lactobasillus, avgjørende fordeler ved bruk som probiotika i næringsmidler og naturopatiske medisiner ved en unik
 20 kombinasjon av gode egenskaper,
- stammen har god resistens overfor magesaft og gallesalter, men til forskjell fra en rekke andre stammer dekonjurerer den ikke gallesaltene,
 - den har stor evne til å assimilere kolesterol,
 - 25 -stammen klarer godt passeringen gjennom magen,
 - stammen har en innvirkning på forholdene i tykktarmsmodellen ved å øke produksjonen av melkesyre deri,
 - stammen er ikke mer pro-inflammatorisk enn vanlige yoghurtbakterier,
 - 30 -stammen forhindrer at tarmceller invaderes av patogene mikroorganismer, som Salmonella typhmuri,um,
 - stammen har en antagonistisk virkning mot den gastriske ulcusbakterien Helicobacter pylori,
 - stammen danner bakteriociner som er aktive mot
 35 clostridiumbakterier,
 - stammen overlever godt i melk såvel som i frossen og tørket form,

- stammen har, til forskjell fra de fleste andre lactobacilli, en gunstig innvirkning på smaken av fermenterte melkeprodukter (gir ingen bismak).

- 5 Den foreliggende stamme av *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei* kan anvendes som en tilsetning til næringsmidler eller som naturopatisk medisin, såkalt "Medical Food", eller som en tilsetning til naturopatisk medisin
- 10 Slike medisiner kan anvendes for barn med det formål å lindre atopiske problemer, for eldre personer for å korrigere endret mikroflora bevirket ved normale aldersforandringer eller en endret sekresjon av saltsyre, og for personer generelt for å normalisere tarmfloraen, idet innholdet av clostridiumbakterier
- 15 rier avtar, lactobacilli og bifidobakterier øker og høye innhold av koliforme bakterier er redusert

Ved hjelp av disse egenskaper avviker stammen LMG P-17806 fra de tidligere kjente stammer, som vil bli vist i de

20 etterfølgende eksempler

Fremstilling av stammen

- Stammen fremstilles på vanlig måte for lactobacilli. Et
- 25 substrat egnet for lactobacilli anvendes. Dette substratet bør for eksempel inneholde minst ett av karbohydratene som stammen kan fermentere i henhold til det som er angitt i det foregående, i kombinasjon med proteiner, vitaminer, mineraler og andre næringsstoffer som normalt kreves av lactobacilli.
- 30 Eksempler på passende kommersielle substater er gjærekstrakt-glukosemedium, MRS (de Man-Rogosa-Sharpmedium), Rogosa, melk tilsatt en mindre mengde gjærekstrakt, osv. Stammen dyrkes mikroaerofilt eller i fullstendig fravær av oksygen, passende ved en temperatur på mellom +15 °C og +42 °C. Dersom
- 35 substratet er podet med 0,1 til 1 % poding er en dyrkingstid på mellom 10 og 40 timer passende. Stammen kan om ønsket konsentreres ved sentrifugering eller filtrering hvoretter konsentratet vaskes for å fjerne dyrkingsmediet. Konsentratet kan deretter fryses etter frysetørkes på vanlig måte. På

denne måten kan preparater med mellom 100 millioner og 100 000 millioner levende bakterier LMG P-17806 per g fremstilles. Et preparat kan deretter anvendes som sådan eller anvendes som en tilsetning til næringsmidler, f.eks
5 til melk eller annet produkt som gir LMG P-17806 muligheten til å overleve og om ønsket til å vokse.

UNDERSØKELSER

10 A. Undersøkelse vedrørende passering av stammen gjennom gastrointestinalkanalen.

LMG P-17806 ble dyrket på den måten som er beskrevet over og tilsatt sammen med yoghurtkultur til melk. Et fermentert
15 produkt ble dannet ved å inkubere melken i 5 timer ved +42 °C. Det ble oppnådd et velsmakende produkt som inneholdt godt og vel 100 millioner levende LMG P-17806 per gram produkt. Friske personer ble gitt 3 x 200 g produkt daglig i en uke. Det totale inntak av LMG P-17806 var mellom 40
20 milliarder og 200 milliarder

Faecesprøver ble undersøkt før inntak, etter en ukes forbruk og en uke etter at inntaket hadde opphørt. Som det fremgår fra tabellene 1 og 2 i det etterfølgende, ble det oppnådd en
25 sterk økning i antallet laktobasiller i forsøksindividene. To isolater per testindivid ble klassifisert som to arter for hver anledning, dvs. totalt 20 isolater. 18 av isolatene for konsumpsjonstiden viste seg å bestå av LMG P-17806 i henhold til fenotypisk klassifisering. Denne bakteriestammen ble
30 ikke funnet i prøvene før eller etter inntaket av LMG P-17806.

I gjennomsnitt var innholdene i faecesprøvene under tilførselen svært høye og varierte kun moderat fra 63 millioner til
35 320 millioner per gram, dvs. med en faktor på 5. Innholdene var bemerkelsesverdig stort sett de samme, uavhengig av de innhold som ble målt før forsøkets start. Etter at tilførselen hadde opphørt gikk innholdene tilbake til det som synes å være naturlig for det aktuelle forsøksindividet.

I tabellene 1 og 2 i det etterfølgende ble innholdet av lactobacilli i faeces bestemt i millioner per gram ved utplating og ved anvendelse av substratet Rogosa.

5

Tabell 1

5 forsøksindivider med opprinnelig lavt innhold av lactobacilli

	Forsøksindivid	Før forsøket	Under forsøket	Etter forsøket
10	1	0,05	120	0,07
	2	0,15	320	0,12
	3	0,08	97	0,14
	4	0,009	63	0,02
	5	<0,001	278	0,002

15

Tabell 2

5 forsøksindivider med høye innholder av lactobacilli

	Forsøksindivid	Før forsøket	Under forsøket	Etter forsøket
20	6	1,2	297	1,3
	7	0,7	83	0,6
	8	0,2	136	0,18
	9	4,3	74	3,5
25	10	0,6	212	0,8

Undersøkelsen viser at stammen har god overlevelse ved passering gjennom gastrointestinalkanalen.

30

B. Undersøkelse som vedrører dannelsen av L-melkesyre ved hjelp av stammen i en tykktarmsmodell

Det fermenterte produktet i det foregående ble tilsatt til en såkalt SHIME-reaktor som er en in vitro-modell av tarmen.

35

Prøver ble tatt fra deler av reaktoren som svarer til de viktigste delene i tykktarmen. Tilsvarende sammenligningsforsøk ble gjennomført med enkelte andre Lactobacillus-stammer, dvs nær beslektet med L. paracasei underart paracasei. Som det fremgår fra den etterfølgende tabell 3 gav LMG P-17806 en sterk økning i dannelsen av L-melkesyre, som er akkurat den melkesyreisomeren som dannes ved LMG P-17806. En dannelsen av melkesyre betraktes som gunstig av en rekke grunner, bl.a. under betraktning av den antibakterielle effekten til melkesyren såvel som det faktum at en lavere pH antas å redusere tilgjengeligheten og dannelsen av nitrogenforbindelser.

Tabell 3

15

Dannelse av L- og D-melkesyre i en SHIME-reaktor etter tilsetning av forskjellige melkesyrebakterier i mg per liter reaktorinnhold

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

25

I tabellen refererer "L" til den venstredreie isomeren av melkesyre og "D" til den høyredreie isomeren.

Reaktor 4 svarer til den øvre delen av tykktarmen, reaktor 5 til den midtre delen og reaktor 6 til den nedre delen av tykktarmen. Undersøkelsen viser at stammen danner L-melkesyre i tykktarmsmodellen.

C. Undersøkelse vedrørende hvordan stammen beskytter tarmepitelceller fra invasjon av Salmonella typhimurium.

35

Tarmepitelceller av typen CaCo-2-celler ble dyrket in vitro. Disse ble tilsatt en kombinasjon av lactobacilli og Salmonella typhimurium i forholdet 100:1 med tilsetning av 1 million salmonella per ml. Effekten ble undersøkt etter

5 inkubasjon i 20 minutter ved 37 °C. Mengden invaderende salmonella ble bestemt ved å vaske platene med adhererende CaCo-2-celler tre ganger. De adhererende celler ble behandlet med antibiotikumet gentamycin i en konsentrasjon på 100 mg/ml i en time for å drepe alle bakterier som ikke hadde

10 invadert celler. Deretter ble platene vasket med PBS for å fjerne alt gentamycin og til slutt ble de fangede bakterier frigitt ved å behandle CaCo-2-celleene med 0,1 % Triton-X under rysting. Antallet salmonella ble deretter bestemt ved vanlig utplatingsmetodologi. LMG P-17806 hadde en utpreget

15 effekt ved at den reduserte antall invaderte celler. Den nær beslektede paracasei-varianten 506 synes på den annen side heller å stimulere invasjonen av salmonellabakterier. Også med hensyn til denne egenskapen viste LMG P-17806 en positiv effekt. Resultatene er angitt i den etterfølgende tabell 4.

20

Tabell 4

Invasjon av salmonella

	Melkesyrebakterier	% invaderende salmonella	
		uten melkesyrebakterier	med melkesyrebakterier
25	LMG P-17806	2,5	0,75
	L paracasei K 506	2,5	7
	L plantarium	2	2
	L rhamnosus	2,5	0,75

30

Tabellen viser at stammen LMG P-17806 gir en markert beskyttelse mot invasjon av salmonellabakterier.

D. Undersøkelse vedrørende beskyttelse mot *Helicobacter pylori*.

35

I en musemodell hvor musene var blitt infisert med *Helicobacter pylori* ble virkningen av tilførsel av et fermentert melkeprodukt med en stamme av LMG P-17806, på den ene side, og uten nevnte stamme, på den annen side, på innholdet av *H. pylori* målt i faeces undersøkt

Musene ble infisert med 100 millioner av stammen *H. Pylori* 17874 i helisk form ved tre anledninger med et intervall på ett døgn. Deretter fikk musene eksperimentelle produkter og innholdet av *H. pylori* i faeces ble målt ved hjelp av hepariniserte magnetkuler og Enzyme Immuno Assay. Tre produkter ble undersøkt. Alle de fermenterte melkeprodukter syntes å redusere andelen *H. pylori*, men effekten forekom betydelig raskere i de tilfeller hvor produktet inneholdt LMG P-17806 sammenlignet med henholdsvis vanlig yoghurt og med en stamme av *L. fermentum* KLD.

Tabell 5

20

Innhold av *H. pylori* i faeces målt ved hjelp av hepariniserte magnetkuler og Enzym Immuno Assay.

Produkt	før inntak	etter inntak i 2 døgn	etter inntak i 7 døgn	7 døgn etter opphørt inntak
Vanlig yoghurt	1,48	1,86	0,63	2,25
Yoghurt med <i>L. Fermentum</i>	1,65	1,62	0,94	1,61
Yoghurt med LMG P-17806	1,80	0,68	0,61	1,71

30

Tallene i tabellen angir absorbanse med 405 nm og er relative innhold.

35

E. Undersøkelse av innvirkningen av stammen LMG P-17806 på immunforsvaret.

Immunforsvarsystemet kontrolleres ved en rekke signalsubstan-
 ser, såkalte cytokiner. Noen av disse kan være protein-
 flammatoriske. Innvirkningen av LMG P-17806 på dannelsen av
 cytokiner TNF-alfa og IL-6 ble sammenlignet med innvirkningen
 5 av to arter inneholdt i en yoghurtkultur, *L. delbrueckei*
 underart *bulgaricus* og *Streptococcus thermophilus*. Leuko-
 cytter ble separert fra humant blod og tilsatt til levende
 bakterier eller bakterier drept med glutaraldehyd i en mengde
 på 10 millioner leukocytter. Som kontroll ble lipopolysakka-
 10 rider (LPS) fra *E. coli* anvendt. Resultatene er angitt i den
 etterfølgende tabell 6. Resultatene viser at LMG P-17806 har
 de samme inflammatoriske egenskaper som vanlig yoghurtkultur
 i den anvendte modellen.

15

Tabell 6

Innvirkningen av stammen LMG P-17806 på immunforsvaret

Melkesyre- bakterier	TNF-alfa mg/l		IL-6 mg/l	
	levende	drept	levende	drept
<i>S thermo-</i> <i>philus</i> , E584	12	1	0,4	<0,1
<i>L bulgari-</i> <i>cus</i> , E585	2	3	0,5	0,1
25 LMG P-17806	4	1	0,7	<0,1

F. Undersøkelse av motstanden hos stammen LMG P-17806 mot
 30 **antibiotika**

Probiotika kan være nyttige for bruk i forbindelse med
 lidelser som gjelder balansen i tarmfloraen under
 medisinerings med antibiotika. Samtidig er det viktig at
 35 probiotika ikke bidrar til å spre motstand mot antibiotika,
 og dette er særlig viktig ved den samtidige bruk av
 probiotika og antibiotika. Motstanden hos stammen LMG

P-17806 mot forskjellige antibiotika er blitt etablert av denne grunn. Sensitiviteten hos stammen LMG P-17806 overfor ulike antibiotika ble bestemt ved å etablere det innhold hvorved en reduksjon i veksten av stammen på 50 %, som målt ved optisk tetthet, ble oppnådd.

Det fremkom at stammen LMG P-17806 var resistent mot vankomycin og ble ikke inhibert selv ved 256 mg/l. Stammen viste noe resistens mot trimetoprim og cefotaxim, idet en optisk tetthet (OD) på 50 % ved henholdsvis 12 og 4 mg/l ble oppnådd. Stammen LMG P-17806 var på den annen side sensitiv overfor klorafenikol, erytromycin, rifampicin og tetracyklin, hvor allerede nivåer under 1 mg/l resulterte i en inhibering av veksten på 50 %.

Påvirkningen av antibiotika ble også undersøkt som en oversikt ved anvendelse av såkalte Sensi discs fra Oxoid. I henhold til disse resultater var LMG P-17806 resistent overfor aztreonam, ceftaximid, cefoxitin, colistinsulfat, kanamycin, polymyxin B, streptomycin og vancomycin.

LMG P-17806 kan således, i henhold til disse resultater være særlig interessant for anvendelse samtidig som terapi med antibiotika slik som vancomycin, trimetoprim såvel som en rekke cefloxaciner, som alle er antibiotika med kjente bivirkninger på tarmfloraen og tarmfunksjonen.

ANVENDELSE AV STAMMEN LMG P-17806

30 Eksempel 1

Fremstilling av bakteriekonsentrat

Et frossent bakteriekonsentrat med 10 milliarder LMG P-17806 per gram ble fremstilt på den måten som er angitt i det foregående ved å dyrke lactobacilli i et næringssubstrat tilsatt 1 g gjærekstrakt per liter ved en konstant pH på 5,5 i 14 timer ved 36 °C. Bakteriene ble separert ved sentrifugering med kontinuerlig vasking av sentrifugatet. Senti-

fugatet ble frosset i flytende nitrogen og deretter lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil bruk.

Eksempel 2

5

Fremstilling av fermentert melkeprodukt

Et melkeprodukt ble fremstilt fra melk ved å homogenisere melken, varmebehandling derav ved $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 minutter og med
 10 temperering til $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Melkeproduktet ble podet med 0,01 % av en kommersiell frossen yoghurtkultur og 0,5 % av LMG P-17806-konsentratet. Kulturen fikk vokse i 6 timer ved den angitte temperatur. Melken hadde da koagulert og pH avtatt til 4,55. Den koagulerte form ble nedbrutt og produktet
 15 avkjølt til $+12\text{ }^{\circ}\text{C}$ hvorefter det ble pakket i vanlige plastkopper som normalt anvendes for yoghurt og etteravkjølt i et kjølerom ved en temperatur på $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en dag og en natt. pH hadde deretter falt til 4,4. Produktet ble deretter lagret ved $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil 3 uker.

20

Innholdet av stammen LMG P-17806 ble målt og som det fremgår fra resultatene i den etterfølgende tabell 7 var der en begrenset vekst av stammen LMG P-17806 under dyrkingen og LMG P-17806 overlevde lagring i tre uker ved pH under 4,4 svært
 25 godt.

Tabell 7

Lagringsevne for stammen LMG P-17806 i melkeprodukt

30	Poding	Innhold i melkeprodukt	Innhold etter kultivering	Etter lagring i 1 uke	Etter lagring i 2 uker	Etter lagring i 3 uker
	9900	49	97	132	118	121

Inneholdene er gitt i millioner per gram

Produktet hadde et normalt utseende med en separasjon av valle på knapt 1 % etter lagring i fjorten døgn. Produktet smakte utmerket og hadde ensartet konsistens og en frisk, mild aroma. Testproduktet fikk bedre bedømmelser enn normal yoghurt i en uavhengig forbrukerundersøkelse gjennomført ved et forskningsinstitutt. Produktet ble sammenlignet i en forbrukerundersøkelse, hvor forsøkspersonene ikke visste hvilket produkt man smakte på, sammen med tilsvarende produkter uten stammen LMG P-17806. Produktet med LMG P-17806 var foretrukket av 74 % av personene i forsøkspanelet, og det mottok en gjennomsnittsverdi på 7,6 i en skala på 9, som er signifikant høyere enn resultatet for vanlig yoghurt. Bedømmelsen var noe mer enn 1 punkt høyere enn en tidligere kjent probiotisk kultur med *Lactobasillus acidophilus*. Resultatene avviker også fra dem som ble oppnådd ved sammenligning mellom henholdsvis ren yoghurt og de blandede produkter av yoghurt og de probiotiske bakterier *Lactobasillus acidophilus* og *Bifidobacterium longum*. Ingen signifikante forskjeller kunne ses mellom ren yoghurt og det respektive blandede produkt i disse sammenligninger.

Eksempel 3

Passende tilsetning av stammen LMG P-17806

Forsøk ble også gjennomført for å finne ut det passende område med hensyn til tilsetning av stammen LMG P-17806. Melk ble behandlet og deretter ble yoghurtkultur tilsatt i henhold til det foregående, mens tilsetning av konsentrat av stammen LMG P-17806 ble variert fra 5 % til 0,01 %. Ved et slikt høyt innhold som 5 % poding av LMG P-17806 ble det oppnådd en bismak, som sannsynligvis stammet fra komponenter i selve podingen. Forandringen i pH var imidlertid normal og produktets utseende var normalt. Innholdet av LMG P-17806 i nylaget produkt var 504 millioner per gram og innholdene forble på dette nivået under lagringen. Ved tilsetning av 0,01 % LMG P-17806 konsentrat kunne produktet ikke skjelnes sensorisk fra vanlig yoghurt og innholdet av LMG P-17806 var allerede etter en uke mindre enn 1 million per ml, som er det

laveste innhold et produkt må inneholde for at det skal være tillatt å angi at produktet inneholder et spesifikt probiotika i henhold til forslag til internasjonal lovgivning.

5 Eksempel 4

Fremstilling av fermentert spesialprodukt

Forsøket ble gjennomført som over med unntak av at melken også fikk tilsatt 0,4 g gjærekstrakt per liter. Podingen ble utført med 0,01 % av den samme yoghurtkultur som over, men kun 0,1 % LMG P-17806 konsentrat ble tilsatt. Inkubasjonen ble gjennomført ved +34 °C i 8 timer hvorefter prosessen ble avbrutt og produktet avkjølt, pakket og lagret som i eksempel 3 i det foregående. LMG P-17806 vokste ti ganger under disse betingelser og tilsvarende som angitt i det foregående overlevde bakteriene godt under lagring. Resultatene er angitt i tabellen i det etterfølgende

20

Tabell 8

Lagringsevne for det spesifikke melkeproduktet av stammen LMG P-17806

25	Poding	Innhold i melkeprodukt	Innhold etter kultivering	Etter lagring i en uke	Etter lagring i to uker	Etter lagring i tre uker
	9900	10	103	114	109	107

Innholdene i tabellene er gitt i millioner per gram produkt.

30 Produktet hadde et normalt utseende med en separasjon av valle på 1,5 % etter lagring i 14 døgn. Produktet hadde en god, tørr aroma og homogen konsistens.

35

Eksempel 5**Fremstilling av vegetabilsk juice inneholdende stammen
LMG P-17806**

5

En vegetabilsk juice ble fremstilt ved å blande gulrotkonsentrat og et appelsinsaftkonsentrat i like deler slik at pH i sluttblandingen ble pH 3,9. Den blandede drikkevare ble varmebehandlet og tilsatt henholdsvis 1 % og 0,1 % LMG P-17806 konsentrat. Innholdet av LMG P-17806 ble henholdsvis 100 og 10 millioner per ml. Drikkevarene ble lagret ved +7 °C i fire uker. Produktets aroma ble ikke påvirket og ingen innvirkning av lagring eller tilsetning av LMG P-17806 ble observert. Tilsetning av LMG P-17806 til et innhold som overskrider 50 millioner synes imidlertid å redusere nedgangen i vitamin C i et produkt uten LMG P-17806, som produktet med 10 millioner bakterier per ml, avtok innholdet av vitamin C fra 25mg/100g før lagring til 18mg/100g etter fire uker. Med tilsetning av 100 millioner LMG P-17806 per ml avtok vitamin C-innholdet kun til 22mg/100g, dvs en mer enn 50 % mindre nedgang i vitamin C-innholdet. LMG P-17806 overlevde godt og innholdet av LMG P-17806 etter fire uker var kun rundt 40 % mindre enn i nylaget produkt uavhengig av den tilsatte mengde

25

I et annet forsøk fikk den samme fruktdrikk tilsatt 5 % LMG P-17806. Dette gav en bismak som ble verre under lagring.

30 **Eksempel 6****Fremstilling av vellingpulver ("Pap-Powder").**

Vellingpulver produseres på vanlig måte. LMG P-17806 konsentrat i henhold til det ovennevnte frysetørkes etter blanding med maisstivelse og lagres etter pakking i en oksygentett emballasje ved en temperatur på -20 °C. Det frysetørkede preparatet inneholdt 61 milliarder LMG P-17806 per gram. Vellingpulveret ble tørrblandet med 0,03 % LMG

P-17806 og pakket i en atmosfære av nitrogengass i en oksygentett emballasje Pulveret ble først lagret i tre måneder ved +12 °C og deretter ved romtemperatur i ytterligere fire måneder Innholdet av LMG P-17806 fremgår klart fra den etterfølgende tabell 9 Vellingpulveret gav gode muligheter for overlevelse med hensyn til LMG P-17806 og det er derfor mulig å fremstille f eks barnematprodukter med et høyt innhold av LMG P-17806

10

Tabell 9

Frysetørket preparat	Pulver før tilsetning	Pulver etter tilsetning	Etter 3 måneder	Etter 7 måneder
61 000	<0,0001	20	18	6,5

15

Innholdet i den ovennevnte tabell er gitt i millioner per gram pulver

20

Vellingpulveret ble oppløst i 9 deler vann ved +50 °C og innholdet av LMG P-17806 ble bestemt Innholdet var i million LMG P-17806 per ml drikkevare i det tilfellet hvor et seks måneder gammelt pulver ble anvendt Vellingproduktet kunne ikke skjernes fra et vanlig produkt. Etter lagring i en natt ved romtemperatur smakte imidlertid vellingproduktet med LMG P-17806-tilsetning lett surt og hadde en pH på 5,7.

25

30

I et annet forsøk ble effekten av tilsetning av henholdsvis 1 % og 0,001 % frysetørket LMG P-17806-preparat undersøkt Innholdene derav i vellingpulveret etter tilsetning var henholdsvis 570 og 0,8 millioner per gram

35

Pulverne ble lagret på en tilsvarende måte og undersøkt etter lagring i 5 måneder. Etter oppløsning som i det foregående var innholdet i det fremstilte vellingproduktet 800 millioner, for den lave tilsetningen henholdsvis mindre enn 10 000 per ml. Med den høye tilsetningen ble en lett sur aroma registrert allerede etter lagring i 4 timer av vellingproduktet ved kroppstemperatur

Eksempel 7**Fremstilling av tørket pulver for anvendelse som "medisinsk ernæringsmiddel".**

5

Et frysetørket LMG P-17806 konsentrat ble blandet med forskjellige mengder maisstivelse i mengdeandelene på henholdsvis 1:1, 1:9, 1:99 og 1:999. De blandede pulvere ble lagret i små poser med 1 til 100 g per pose. Materialet i 10 posene var tett med hensyn til oksygen og vanndamp. Posene ble lagret i henholdsvis fryser, kjølerom og ved romtemperatur. Innholdet ble deretter anvendt som et additiv til en drikkevare ved å blande pulveret med drikkevaren før drikkevaren konsumeres. Tilsvarende overlevelse som i 15 eksempel 6 i det foregående ble oppnådd. Pulveret med mengdeandelen 1:1 ble også pakket i gelatinkapsler med 0,4 g per kapsel. Antall bakterier per kapsel var 10 milliarder. Kapslene ble vakuumpakket i et materiale med gode isolerende egenskaper overfor oksygen og vanndamp. Kapslene ble lagret 20 på samme måte som angitt i det foregående og tilsvarende gode overlevelsesresultater ble oppnådd.

Eksempel 8**25 Fremstilling og bruk av bakterieblandinger**

LMG P-17806 kan blandes med andre lactobacilli uten å inhibere dem. LMG P-17806 synes ikke å danne noen substanser som inhiberer andre lactobacilli eller lactococci hvor LMG P- 30 17806 ko-kultiveres med yoghurtkulturer, kulturer av surmelk med lactococci eller andre lactobacilliarter som *L. acidophilus*, *L. fermentum* eller *L. rhamnosus*. Forsøk med blandinger av frysetørkede preparater som inneholder alle disse tre bakterier har indikert uforandrede lagringsegenskaper enten blanding ble utført med maisstivelse eller med 35 vellingspulver. Etter oppløsning av vellingspulveret og en lagring i 12 timer ved kroppstemperatur og 12 timer ved romtemperatur kunne ingen negativ innvirkning av LMG P-17806

spores, verken på det totale innholdet av lactobacilli eller på innholdet av noen av bakteriene.

I et forsøk for å fremstille probiotisk surmelk ble 0,5 % surmelkskultur og 0,6 % frysetørket konsentrat av hver av L. acidophilus NCFB 1748, L fermentum KLD og LMG P-17806 tilsatt til normalt behandlet konsummelk. Kun 0,1 % KLD ble imidlertid tilsatt, fordi høyere tilsetninger førte til bismak og til et uønsket koagel. Melk ble lagret i 19 timer ved romtemperatur. Da var pH i melken 4,50. Melken ble avkjølt til +10 °C, pakket og lagret ved +6 °C eller opptil 14 dogn. Resultatene fremgår klart fra den etterfølgende tabell

10

15

Tabell 10

Melkesyre- bakterier	Før avkjøling	Etter 5 dager	Etter 14 dager
Lactococci	730	810	580
L acidophilus	135	142	131
L fermentum	12	14	9
LMG P-17806	112	126	109

20

Innholdene er i millioner per ml av de forskjellige bakterier.

25

80 friske forsøksindivider ble gitt produktene for spising i forbindelse med en konferansereise til Istanbul i Tyrkia. Gruppen ble delt i to, én som spiste en surmelk i henhold til det overnevnte med kun LMG P-17806 mens den andre spiste probiotisk surmelk med tre forskjellige probiotiske stammer. Forsøksindividene var på konferansestedet i 8 dogn. De begynte å spise produktene to dogn før avgang til konferansestedet og fortsatte å spise dem i fire dogn etter at de kom hjem. Produktene ble spist som 3 snacks som var jevnt fordelt i løpet av dagen med 150 g/måltid. Alle forsøksindivid-

35

ene unntatt to personer i surmelksgruppen erklærte at de spiste produktet i henhold til planen. I en undersøkelse ble de spurt om å angi ubehag i gastrointestinalkanalen i form av magesmerter, spenninger, diaré eller forstoppelse på en 5 tredelt skala. Bortsett fra diaré var der så langt en forskjell at 5 % av forsøksindividene som kun hadde spist LMG P-17806 angav at de hadde hatt alvorlig eller svært alvorlig diaré i løpet av minst to døgn mens denne forekomst var kun 22 % i gruppen som spiste den probiotiske surmelken

10

Det synes således som om en blanding av flere ulike lactobacilli kan være enda mer effektiv enn kun en enkel bakteriestamme. Dette kan skyldes det faktum at de administrerte lactobacilli hadde ulike egenskaper.

Patentkrav

1. Stamme av *Lactobacillus* som er en Gram-positiv, homofermenterende, stavformet bakterie som er i stand til å danne L-melkesyre, og hvis stamme er
 5 anvendbar som probiotika i næringsmidler og naturopatiske medisiner og som in vitro er resistent overfor saltsyre og magesafter og tolererer gallesalter uten å dekonjugere dem, mens en sterk assimilering derav forekommer, som har stor evne til å assimilere kolesterol og som har god overlevelse ved passering gjennom magen og gastrointestinalkanalen og hvis stamme vokser optimalt ved omtrent 37
 10 °C, karakterisert ved at stammen er *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei*, har deponeringsnummer LMG P-17806, deponert ved The Belgian Coordinated Collections (BCCM/LMG) i henhold til Budapestkonvensjonen, hvis stamme inneholder tre plasmider med en størrelse på henholdsvis 2,2, 4,36 og
 15 9,1 Kb.
2. Stamme som angitt i krav 1, karakterisert ved at den inneholder 44 % GC.
- 20 3. Stamme som angitt i krav 1 eller 2, karakterisert ved at den er blitt isolert fra prøver fra gastrointestinal-mikrofloraen i mennesker.
4. Stamme som angitt i krav 1, 2 eller 3, karakterisert ved at stammen fermenterer ribose, adonitol, galaktose, glukose, fruktose, mannose,
 25 sorbose, mannitol, sorbitol, N-acetyl-glukosamin, esculin, cellobiose, maltose, laktose, sakkarose, trehalose, inulin, melezitose, D-turanose og D-tagatose.
5. Stamme som angitt i krav 1, 2, 3 eller 4, karakterisert ved at den er tilveiebragt som et konsentrat i form av et frossent eller frysetørket pulver.
 30
6. Anvendelse af en stamme som angitt i ett eller flere av de foregående krav i næringsmidler og/eller som naturopatiske medisiner, karakterisert ved at stammen *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei* er tilsatt til et melkeprodukt, et fermentert melkeprodukt, til
 35 fruktdrikker eller vegetabiliske drikker som vegetabilisk juice, sitrusfruktjuice eller

juice fra en annen frukt eller plante i et innhold på mellom 0,001 % og 5 %, foretrukket mellom 0,01 % og 1 %.

7. Anvendelse af en stamme som angitt i ett eller flere av kravene 1 – 4 som
5 et probiotika i næringsmidler og/eller naturo-patiske medisiner,
k a r a k t e r i s e r t v e d at stammen Lactobacillus paracasei underart
paracasei i henhold til oppfinnelsen er kokultivert med yoghurtkulturer og
surmelkskulturer med laktokokker eller andre lactobacillusarter som L.
acidophilus, L. fermentum eller L. rhamnosus.
- 10
8. Anvendelse af en stamme som angitt i krav 6 eller 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at stammen Lactobacillus paracasei underart paracasei
i henhold til oppfinnelsen er til stede i et innhold på mellom 1 million og 10 000
millioner levende bakterier per gram komposittprodukt.
- 15
9. Produkt inneholdende stammen Lactobacillus paracasei underart paracasei
som angitt i ett eller flere av kravene 1 – 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at
produktet omfatter et melkeprodukt, et fermentert melkeprodukt, en vegetabilsk
drikk eller fruktdrikk eller vellingpulver som alle inneholder stammen Lactobacillus
20 paracasei underart paracasei i et innhold på 5×10^5 - 5×10^9 , vanligvis 1×10^5 -
 10^9 levende bakterier per g produkt, svarende til 0,0005 - 0,5 % av produktet,
eller en konsentrert naturopatisk medisin hvor stammen Lactobacillus paracasei
underart paracasei er til stede i et innhold på 1000 til 100 000 millioner levende
bakterier per g produkt svarende til 0,001 - 100 % av produktet.
- 25
10. Produkt som angitt i krav 9 inneholdende det angitte innholdet av
bakterier,
k a r a k t e r i s e r t v e d at, i tilfellet av næringsmiddelprodukter, inneholder
det ytterligere en liten mengdeandel, f.eks. 0,001 - 0,1 %, gjærekstrakt eller
30 andre substanser som bidrar til vekst eller overlevelse av Lactobacillus paracasei
underart paracasei i produktet,
og at, i tilfellet av naturopatiske medisiner, inneholder det substanser som er
viktige for overlevelsen til bakteriene og/eller rester av kultursubstratet.
- 35 11. Produkt som angitt i krav 9 eller 10,

karakterisert ved at stammen *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei* er tilveiebragt som et konsentrat i en frossen eller frysetørket tilstand for blanding inn i et melkeprodukt, et fermentert melkeprodukt, en vegetabilsk drikk eller en fruktdrikk, i vellingpulver eller i en konsentrert naturopatisk medisin
5 før produktet konsumeres.

12. Produkt inneholdende en stamme av *Lactobacillus paracasei* underart *paracasei* som angitt ett eller flere av kravene 1 – 5,
karakterisert ved at den anvendes for barn for det formål å lindre
10 atopiske problemer, for eldre personer for å korrigere endret mikroflora bevirket ved normale forandringer på grunn av alder eller en endret sekresjon av saltsyre, og for personer generelt for å normalisere tarmfloraen i hvilket tilfelle innholdet av clostridiabakterier er avtagende, bifidobakterier er økende og høye innhold av koliforme bakterier er avtagende.

15