

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037388**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.03.23

(21) Номер заявки

201890223

(22) Дата подачи заявки

2016.06.30(51) Int. Cl. **A61K 35/747** (2015.01)**A61P 3/00** (2006.01)**C12R 1/225** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)

**(54) ШТАММ LACTOBACILLUS PARACASEI ДЛЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ
ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ С СОПРЯЖЕННЫМИ СВЯЗЯМИ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭТОТ ШТАММ, И ИХ
ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **UB 2015 A 002376**(32) **2015.07.07**(33) **IT**(43) **2018.06.29**(86) **PCT/EP2016/065245**(87) **WO 2017/005584 2017.01.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

АЛЬФАСИГМА С.п.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Вискоми Джузеппе Клаудио,**Сфорцини Аннализа, Манджино****Пьерлуиджи, Элли Марина (IT)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) ILARIA CARAFA ET AL.: "Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese", *FOOD MICROBIOLOGY*, vol. 48, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 123-132, XP055298635, GB, ISSN: 0740-0020, DOI: 10.1016/j.fm.2014.12.003 page 125, column 1, paragraph 2

WO-A1-2007074010

OGAWA J ET AL.: "Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria", *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 100, no. 4, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 355-364, XP027707241, ISSN: 1389-1723 [retrieved on 2005-10-01] cited in the application, page 357, column 1, paragraph 1; table 2

ROMERO-PÉREZ G A ET AL.: "A rapid method of screening lactic acid bacterial strains for conjugated linoleic acid production", *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, JAPAN SOCIETY FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND AGROCHEMISTRY, TOKYO, JAPAN*, vol. 77, no. 3, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 648-650, XP002754919, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/BBB.120709 [retrieved on 2013-03-07] page 649; tables 1, 2

(57) Настоящее изобретение относится к новому штамму, принадлежащему к виду *Lactobacillus paracasei*, способному превращать линолевую кислоту в линолевою кислоту с сопряженными связями. Настоящее изобретение также относится к питательным препаратам, или пищевым продуктам, и/или фармацевтическим композициям, которые содержат штамм *Lactobacillus paracasei* и могут быть использованы для лечения и/или профилактики патологий и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом линолевой кислоты с сопряженными связями, или в случае, когда рекомендуется применение пробиотика.

B1**037388****037388****B1**

Предшествующий уровень техники

Настоящее изобретение относится к новому штамму, принадлежащему к виду *Lactobacillus paracasei*, обозначаемому LMG S-26420 и способному превращать линолевую кислоту (LA) в линолевую кислоту с сопряженными связями (CLA), который используется для лечения и профилактики заболеваний и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом линолевой кислоты с сопряженными связями, или в случае, когда рекомендуется применение пробиотика; к способам получения такого штамма и к фармацевтическим или питательным композициям, содержащим это штамм.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 может быть также использован для лечения и профилактики всех расстройств, при которых введение пробиотика дает благоприятный эффект, например для сохранения и поддержания баланса кишечной флоры.

Термин CLA означает смесь изомеров положений и геометрических изомеров линолевой кислоты (LA), где двойные связи являются сопряженными в различных положениях, образуя тем самым цис- и транс-изомеры.

Известны по меньшей мере 16 изомеров CLA, и изомерами, представляющими особый биологический интерес, являются изомеры c9-t11 и t9-t11. Изомер c9-t11 является преобладающим изомером в пище, и было подтверждено, что он играет важную роль, поскольку он участвует во многих биологических процессах и включен в фосфолипидную фракцию тканей животных, содержащих смеси изомеров CLA.

CLA продуцируется в организме человека в основном на низком уровне, а поэтому ее недостаток восполняется употреблением молочных продуктов и мяса с пищей или добавок, содержащих пробиотические бактерии.

Продукты животного происхождения, полученные от жвачных животных, являются основными источниками CLA для человека. Такие источники являются промежуточными соединениями реакции биогидрогенизации линолевой кислоты, и хорошо известно, что продуцирование CLA у жвачных животных происходит посредством реакции неполной биогидрогенизации ненасыщенных кислот, а именно линолевой кислоты, осуществляемой бактериями жвачных животных.

CLA вводится в организм вместе с молоком, рыбой, мясом и молочными продуктами, и ее полезное действие коррелирует с ежедневным ее потреблением на уровне приблизительно 3 г/день. При несбалансированной диете в среднем потребление CLA составляет 0,35 г/день, и этот дефицит должен быть компенсирован посредством употребления пробиотиков, превращающих LA в CLA, что будет обеспечивать нужные дозы, которые, как считается, оказывают полезное действие на организм.

Биологическая активность линолевых кислот с сопряженными связями обусловлена главным образом действием изомеров c9-t11 и t10-c12; причем основная биологическая активность, ассоциированная с противораковым действием, обусловлена изомером c9-t11, а изомер t10-c12 участвует в метаболизме липидов в организме человека.

CLA обладает важными биологическими свойствами и является полезной для здоровья человека и животных, например при воспалительных заболеваниях кишечника, диарее и воспалении толстой кишки, для увеличения массы тела, для повышения термогенеза, для защиты от окислительного стресса, для предупреждения образования опухолей и при аутоиммунных заболеваниях, воспалительных заболеваниях, диабете и атеросклерозе.

Ecker J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 388, 2009, 660-666 сообщают, что изомер c9-t11 активирует ген-мишень LXR, участвующий в развитии и прогрессировании атеросклероза. Ogawa J. et al., *Appl. Env. Microbiol* 2001, 67, 1246 описывают продуцирование специфических изомеров CLA из линолевой кислоты лактобациллами, *Lactobacillus acidophilus*, в микроаэрофильных условиях и высказывают предположение, что оксикислота 10-гидрокси-цис-12-октадеканонид является промежуточным соединением такой реакции превращения и что эта реакция превращения осуществляется более чем за одну стадию.

Ogawa J. et al., *J. Bioscience Bioeng.* 100 (4), 355 (2005) сообщают о превращении LA в CLA бифидобактериями и лактобациллами с образованием смеси изомеров. При использовании бифидобактерий продуцирование изомеров CLA варьируется приблизительно от 3 до 400 мг на литр культуры, а при использовании лактобацилл продуктивность варьируется приблизительно от 100 мг до 4 г на литр культуры. При использовании *Lactobacillus casei* продуктивность никогда не превышает 1 г на литр культуры.

Rosberg-Cody E. et al., *Appl. Env. Microbiol* 70 (8) 4635, 2004 описывают выделение штаммов бифидобактерий из материала фекалий новорожденных, используемого для продуцирования CLA, и предлагают использовать эти бактерии в добавках для питания новорожденных с риском некротирующего энтероколита.

Кроме того, Coakley M. et al., *J. Appl. Microbiol.* 94, 138 (2003) описывают способность лактобацилл, лактококков и бифидобактерий превращать LA в CLA, и ими было продемонстрировано, что штаммы бифидобактерий обладают более высокой способностью превращать LA в CLA, и процент такого превращения составляет почти 65%.

Alonso L. et al., *J. Dairy Sci.* 86, 1941 (2003) описывают превращение LA в CLA бактериями *Lactobacilli casei* и *Lactobacilli acidophilus* кишечника человека в среде с добавлением различных концентраций линолевой кислоты. При концентрациях линолевой кислоты 0,02% максимальная концентрация CLA, продуцируемой бактерией *Lactobacillus casei*, составляет приблизительно 110 мг на литр культуры, а ко-

личество изомера с9-t11, представляющего биологический интерес, составляет от 60 до 85 мг на литр культуры.

Gustavo A. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (3), 648-650, 2013 описывают быстрый и более простой метод скрининга бактерий, продуцирующих линолевую кислоту с сопряженными связями (CLA) и выделенных из коровьего молока. Один штамм, подобный *L. Paracasei*, превращает свободную линолевую кислоту в полноразмерную CLA более чем на 85%. Однако процент превращения изомера CLA с9,t11, представляющего биологический интерес, составляет приблизительно лишь 18%.

Oguz Gursoy et al., *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(5), 610-615 описывают влияние использования различных культур пробиотиков на концентрацию линолевой кислоты с сопряженными связями и на состав жирных кислот в сыре. Эти авторы сообщают, что различия пробиотиков и способ их хранения не влияют на статистическое содержание CLA в образцах. Повышение содержания CLA в образцах сыра обусловлено липолизом свободной линолевой кислоты молочнокислыми бактериями.

Потребление пробиотических продуктов, содержащих лактобациллы, также является полезным для поддержания баланса бактериальной флоры кишечника и может оказаться ценным средством для профилактики и лечения дисбиоза в целом, где баланс между бифидобактериями и лактобациллами имеет очень важное значение.

Принимая во внимание низкое содержание CLA в пище и учитывая дозу, подходящую для лечения всех патологий и расстройств, ассоциированных с дефицитом CLA, необходимо получить бактерии, превращающие LA в CLA для приготовления суточных доз, полезных для здоровья индивидуума и используемых для лечения всех патологий, при которых изомеры CLA дают благоприятный эффект.

Бифидобактерии превращают LA в CLA, но культуры бифидобактерий имеют недостаток, заключающийся в низком выходе продукта, а именно числа бактерий на литр культуры, а поэтому эти бактерии трудно получить в большом количестве в промышленном масштабе.

Следовательно, необходимо получить бактериальный штамм, который обладал бы способностью превращать LA в CLA, продуцируемую бактериальными культурами с высокой продуктивностью, и который мог бы быть использован в фармацевтических или питательных препаратах для лечения или профилактики всех расстройств и патологий, ассоциированных с дефицитом CLA.

Также необходимо получить бактериальный штамм, принадлежащий к роду *Lactobacillus* и способный превращать LA в изомеры CLA, полезные для человека или животных. Кроме того, также необходимо получить лактобациллы для лечения всех расстройств или патологий, ассоциированных с микробным дисбалансом на поверхности тела. Штамм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, может быть введен в комбинации с бактериями рода *Bifidus* для стимуляции баланса микробов флоры человека или животного.

Бактериями, принадлежащими к роду *Lactobacillus*, являются бактерии с наивысшей продуктивностью, а поэтому они являются более предпочтительными, чем бактерии, принадлежащие к роду *Bifidobacterium*, для превращения LA в CLA. Лактобациллы могут быть получены промышленными способами с более высоким выходом, чем бифидобактерии, и могут быть использованы для получения питательных или фармацевтических композиций, вводимых человеку или животному.

Среди этих бактерий предпочтительными являются лактобациллы, обладающие большей способностью превращать LA в изомеры с9-t11 и t9-t11 CLA, чем в другие изомеры. с9-t11 является главным изомером, поскольку он участвует в образовании фосфолипидов клеточной мембраны и является преобладающим изомером, присутствующим в пищевых продуктах. Эти изомеры оказывают полезное действие на человека и животных, а в частности изомер t9-t11 обладает антипролиферирующими и противораковыми свойствами. Ecker J. et al., *Biochem. Biophysical. Res. Comm.* 388, 660, 2009 сообщают, что изомер t9-t11 CLA является сильным агонистом макрофагального LXR, ассоциированного с процессами индукции воспаления, и играет важную роль в замедлении атеросклеротических процессов у животных-моделей.

В настоящем изобретении описан штамм, принадлежащий к роду *Lactobacillus* и называемый *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, и этот штамм способен превращать LA в CLA с большим процентом превращения, чем другие штаммы лактобацилл, известные специалистам. Кроме того, штамм LMG S-26420 согласно изобретению характеризуется способностью превращать LA в CLA, где смесь изомеров с9-t11 и t10-c12 преобладает по сравнению с другими изомерами.

Этот штамм получают с использованием бактериальных культур, характеризующихся продуктивностью более чем 4 г на литр культуры, и такой штамм может быть получен в лиофильной форме.

Этот штамм является стабильным, и такой продукт бактериальной культуры может храниться в течение длительного периода времени при температуре ниже 0°C или более 6 месяцев при 4°C в лиофильной форме. Штамм LMG S-26420 может содержаться в питательных препаратах, или в пищевых продуктах, или в фармацевтических композициях, используемых для лечения и/или профилактики расстройств или патологий, ассоциированных с дефицитом CLA, и всех расстройств, при которых потребление пробиотиков будет полезным для человека или животных.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описан новый штамм, принадлежащий к роду *Lactobacillus*, называемому

Lactobacillus paracasei и депонированному в Бельгийской Объединенной коллекции микроорганизмов ВССМ/бактерий LMG - Микробиологической лаборатории университета Гента - 15 апреля 2011 под номером LMG S-26420.

Бактерия *Lactobacillus Paracasei* LMG S-26420 характеризуется тем, что она превращает линолевую кислоту в линолеую кислоту с сопряженными связями на более чем 30%.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется тем, что он превращает линолеую кислоту (LA) в линолеую кислоту с сопряженными связями (CLA) на более чем 30% по сравнению с исходной LA, где биологические изомеры с биологической активностью c9-t11 и t9-t11 составляют более чем 30% по сравнению с другими изомерами CLA.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется тем, что он продуцирует CLA в высокой концентрации.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 получают из бактериальных культур, характеризующихся продуктивностью более чем 4 г на литр культуры и выходом колониеобразующих единиц (КОЕ) более чем 1×10^9 на миллилитр культуры.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется своей стабильностью: он может храниться при температуре ниже 0°C, и в течение периода времени более чем 6 месяцев при 4°C в лиофильной форме.

Лиофильный штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется тем, что в нем количество живых клеток составляет более чем 1×10^{10} , а в частности приблизительно от 1×10^{10} до 7×10^{10} единиц на грамм лиофильного продукта.

Целью настоящего изобретения является разработка способа продуцирования штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в бактериальной культуре, где инокулят штамма LMG S-26420 имеет концентрацию от 0,1 до 10% (об./об.) в культуральной среде при температуре от 30 до 37°C, при величинах pH от 4,5 до 7,5, в течение периода времени от 6 до 15 ч. Биомассу разделяют, после чего она может храниться при температуре ниже 4°C или может быть подвергнута лиофилизации.

Описанный способ позволяет получить штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 с числом колониеобразующих единиц (КОЕ) от 1×10^9 до 1×10^9 на миллилитр культуры и с биомассой в количестве от 10 до 20 г/л культуры.

Способ, включающий лиофилизацию, позволяет получить штамм LMG S-26420 в твердой форме. В присутствии криозащитных агентов полученный штамм имеет выход колониеобразующих единиц (КОЕ) более чем 50%, а лиофильный штамм LMG S-26420 содержит клетки в количестве более чем 1×10^{10} на грамм лиофильного продукта.

Целью настоящего изобретения являются питательные препараты или пищевые продукты и фармацевтические композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в лиофильной форме в количестве, соответствующем количеству живых клеток приблизительно от 1×10^8 до приблизительно 5×10^{11} .

Питательные препараты или пищевые продукты и фармацевтические композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть приготовлены в форме саше, таблеток или капсул. Питательные препараты или пищевые продукты и фармацевтические композиции могут содержать пребиотики, витамины, минеральные соли и фармацевтические или питательные наполнители.

Пребиотики, содержащиеся в композициях *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, выбраны из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов, инулинов, галакто-олигосахаридов, ксило-олигосахаридов, изомальто-олигосахаридов и витаминов, выбранных из группы, включающей витамины комплекса E и B.

Питательные препараты или пищевые продукты и фармацевтические композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут включать бифидобактерии.

Композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть использованы для лечения и профилактики патологий и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом линолевой кислоты с сопряженными связями, и во всех других случаях, где использование пребиотика дает ценный и полезный эффект.

В частности, композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть использованы для лечения и профилактики патологий и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом CLA, таких как, например, воспалительные заболевания кишечника, диарея и воспаление толстой кишки; для увеличения массы тела; для повышения термогенеза; для защиты от окислительного стресса; для предупреждения образования опухолей; и для лечения и профилактики аутоиммунных заболеваний, диабета и атеросклероза.

Целью настоящего изобретения являются композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 вместе с бифидобактериями и используемые для лечения всех расстройств, ассоциированных с бактериальным дисбиозом.

Композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть использованы при всех физиологических состояниях, при которых баланс бактериальной флоры кишечника у человека и животных должен оставаться неизменным.

Описание изобретения

Чистая бактериальная культура штамма, принадлежащего к роду *Lactobacillus paracasei*, была депонирована в Бельгийской Объединенной коллекции микроорганизмов ВССМ/бактерий LMG Микробиологической лаборатории - Университета Гента под номером LMG S-26420.

Настоящее изобретение относится к новому штамму *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, к фармацевтическим, питательным или пищевым композициям, содержащим указанный штамм, и к их применению для лечения и/или профилактики патологий и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом линолевой кислоты с сопряженными связями, или в случае, когда рекомендуется применение пробиотика.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 был выделен из бактериальной флоры влагалища здоровой женщины и отобран из многих других штаммов лактобацилл, выделенных одновременно из одного и того же источника и из биологических образцов других типов и из других штаммов одного и того же вида, поскольку было обнаружено, что этот штамм способен превращать линолеовую кислоту (LA) в линолеовую кислоту с сопряженными связями (CLA). Благодаря этому свойству такой штамм становится пробиотическим агентом, полезным для человека и животного.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется тем, что он превращает LA в CLA на более чем 30%, как было определено хроматографическим методом.

Lactobacillus paracasei LMG S-26420 превращает LA в изомеры CLA с биологической активностью, а в частности в изомеры c9-t11 и t9-t11. В конкретном аспекте изобретения *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращает LA в изомеры c9-t11 и t9-t11 CLA на более чем 30%.

Для оценки способности штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращать LA в CLA было применено три различных метода: метод Ogawa, метод Liu и хроматографический метод.

Применение метода Ogawa J., описанного в *Appl. Environ. Microbiol* 67(3): 1246-1252, 2001, позволяет определить способность штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращать LA в CLA в подходящей культуральной среде после добавления LA в бактериальную культуру для метаболической адаптации клеток.

В первом случае, LA, в различных концентрациях от 0,01 до 1 мг/мл, добавляют к серии клеточных культур штамма LMG S-26420, и эти клетки инкубируют в течение периода времени от 1 до 4 дней при температуре от 30 до 40°C. Конечный продукт центрифугируют и к клеткам добавляют LA в постоянной концентрации, равной 5 мг/мл. Клеточные культуры инкубируют при температуре от 30 до 40°C в течение периода времени от 40 до 80 ч, а затем центрифугируют для удаления супернатанта. Для оценки способности штамма превращать LA в CLA клетки ресуспендируют в воде и определяют CLA спектрофотометрическим методом.

Во втором случае LA в постоянной концентрации, равной 5 мг/мл, добавляют к серии клеточных культур *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, и биомассу, полученную по окончании культивирования, инкубируют с LA в различных концентрациях от 0,05 до 0,4 мг/мл.

В обоих случаях было показано, что *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 является эффективным для превращения LA в CLA, в частности на более чем 30%.

Применение метода Liu P., описанного в *Biomed. & Biotechnol.* 12811, 923-930, 2011, включает инокуляцию штамма LMG S-26420 в адекватной культуральной среде с LA в концентрациях от 0,05 до 1 мг/мл. Эти культуры инкубируют в течение периода времени от 1 до 3 дней при температуре от 30 до 40°C, а затем центрифугируют. Концентрации CLA определяют спектрофотометрическим методом.

Испытания, проводимые методами Ogawa и Liu, выявили способность штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращать LA в CLA. Однако эти методы не позволяют определить процент превращения в изомеры CLA, а в частности если этот штамм способен превращать LA в изомеры CLA, обладающие наивысшей биологической активностью.

Хроматографический метод, в свою очередь, позволяет разделять и количественно оценивать геометрические изомеры CLA, изомеры транс-транс, транс-цис и цис-цис, а в частности изомеры цис9-транс11, транс10-цис12 и транс9-транс11.

Полученные изомеры CLA были определены с помощью жидкостной хроматографии высокого давления на ионах серебра (ЖХВД) с помощью диодно-матричного детектора и УФ-детектора на 234 нм.

Хроматографический метод продемонстрировал, что штамм LMG S-26420 превращает LA в CLA на более чем 30%.

Хроматографический метод продемонстрировал, что штамм LMG S-26420 превращает LA в CLA на 30-50%, где процент изомеров с биологической активностью, c9-t11 и t9-t11, превышает процент других изомеров. В частности, штамм LMG S-26420 превращает LA в изомеры CLA c9-t11 и t9-t11, где количество этих изомеров на 40% больше, чем количество всех других геометрических изомеров CLA.

Штамм LMG S-26420 получают из бактериальных культур, характеризующихся числом колониеобразующих единиц (КОЕ) более чем 1×10^9 /мл и количеством твердой массы более чем 4 г/л культуры. Полученный новый бактериальный штамм является стабильным при температуре ниже 4°C в течение более длительных периодов времени и может быть лиофилизирован способами, позволяющими в значи-

тельной степени сохранять жизнеспособность клеток. Лиофилизированные продукты являются стабильными в течение более чем 3 месяцев при температуре 4 и 25°C.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 продуцирует лиофилизованную биомассу в количестве более чем 4 г/л культуры, а в частности от 10 до 20 г/л культуры. Принимая во внимание способность этого штамма превращать LA в CLA в количестве более чем 30%, можно сказать, что новый штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 способен продуцировать CLA в значительных концентрациях. Так, например, добавление *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 к растворам, содержащим линолеовую кислоту в концентрации приблизительно 500 мг/л, приводит к получению линолевой кислоты с сопряженными связями в концентрации более чем 250 мг/л.

Другое преимущество настоящего изобретения заключается в том, что новый штамм, принадлежащий к роду *Lactobacillus* и способный превращать LA в изомеры CLA с высокими выходами превращения, может быть подходящим для его включения в питательные препараты, или в пищевые продукты, или в фармацевтические композиции.

Новый штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 может быть включен к композиции, которые также содержат другие бактериальные штаммы, принадлежащие к одному и тому же роду или к другому роду, подобному бифидобактериям.

Композиции, содержащие LMG S-26420 и другие бактериальные штаммы, продуцируют преимущественно гетерогенную популяцию пробиотиков, подходящую для поддержания баланса бактериальной флоры в кишечнике.

Бактериальные культуры, которые являются целью настоящего изобретения, были продуцированы сначала в лабораторном, а затем в промышленном масштабе. Бактериальная культура LMG S-26420 была получена ферментативным способом в течение периода времени от 6 до 12 ч при температуре от 30 до 40°C в среде, обозначаемой MRS® (De Man, Rogosa & Sharpe) и содержащей в качестве главных ингредиентов дрожжевой экстракт, смеси пептонов и глюкозы, а также соли калия, аммония, магния и марганца.

Было проведено множество фаз размножения первичных культур для увеличения числа клеток на объем культуры чистого штамма с получением так называемых "маточных культур", которые были использованы в качестве инокулята для промышленного продуцирования бактериальных культур пробиотического LMG S-26420.

Промышленный способ продуцирования *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 включает следующие стадии:

инокуляция штамма LMG S-26420 маточными культурами в процентах по объему от 0,1 до 10% и сбраживание в адекватной культуральной среде при 37°C и pH 4,5-7,5 в течение 8-15 ч;

отделение бактериальной биомассы от культурального бульона путем центрифугирования.

Биомасса может быть заморожена или подвергнута лиофилизации после добавления подходящих криозащитных агентов, выбранных из подходящих углеводов, которые могут быть использованы для поддержания жизнеспособности клеток в процессе лиофилизации.

Штамм LMG S-26420 получают ферментативными способами, характеризующимися продуцированием жизнеспособных клеток в количестве более чем 10^9 жизнеспособных клеток на миллилитр культуры и биомассы лактобацилл более чем 4 г/л культуры.

Штамм LMG S-26420 получают с продуктивностью от 1×10^{10} до 7×10^{10} жизнеспособных клеток на миллилитр культуры и с выходом осушенного продукта от 10 до 20 г/л.

Жизнеспособность клеток определяют методами подсчета бактерий, известными специалистам.

Штамм LMG S-26420, полученный из описанных культур, может быть лиофилизован для его надежного хранения и добавления в пищу, в продукты питания или в фармацевтические препараты.

Способ лиофилизации проводят в присутствии криозащитных агентов, выбранных из растворимых углеводов, таких как, например, трегалоза и циклодекстрины или их смесь. Описанный способ лиофилизации характеризуется получением лиофильного штамма LMG S-26420 с выходом жизнеспособных клеток более чем 50% по сравнению с выходом клеток до лиофилизации. Штамм LMG S-26420 характеризуется тем, что он содержит жизнеспособные клетки в количестве приблизительно более чем 1×10^{10} на грамм лиофильного продукта, а в частности приблизительно от 1×10^{10} до 7×10^{10} на грамм лиофильного продукта. Это подтверждает, что штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 характеризуется высокой продуктивностью, может быть лиофилизован и может храниться как лиофильный продукт с клетками, сохраняющими подтвержденную жизнеспособность.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, полученный с использованием описанных клеточных культур и лиофилизированный в присутствии криозащитных агентов, выбранных из растворимых углеводов или их смесей, характеризуется активностью в воде (a_w) ниже 0,6, то есть величиной, ниже которой происходит ингибирование пролиферации большинства бактерий и мучнистой росы. Активность в воде представляет собой величину, полученную путем измерения парциального давления пара в веществе, деленного на парциальное давление воды, и определяемую с помощью детекторов для непосредственного измерения этих величин.

Как описано Ryser, E.T. et al., *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3rd ed.). CRC Press. 173-174,

(2007), величины активности в воде ниже 0,6 указывают на то, что лиофильный препарат может храниться в течение определенного периода времени, поскольку он не разлагается из-за пролиферации микробов, которая является одной из самых главных причин порчи пищи или пищевых продуктов.

Лиофильные продукты штамма LMG S-26420s характеризуются повышенным числом жизнеспособных клеток на грамм лиофильного продукта и низким уровнем активности в воде, и эти продукты могут храниться в виде препаратов композиций или препаратов в различных формах, содержащих различные количества пробиотиков без каких-либо ограничений.

Бактериальный штамм LMG S-26420 в растворах, подвергаемый лиофилизации, характеризуется тем, что он имеет величины температур перехода в стекловидное состояние T_g более чем 100°C , а в присутствии растворимых углеводов, таких как, например, трегалоза, температуры перехода в стекловидное состояние составляют от 100 до 120°C . Эти величины подтвердили, что данный штамм может быть подвергнут лиофилизации и вакуумной сушке при температурах до 100°C без превращения продукта в стекловидное состояние и без последующей потери его свойств.

Температура перехода замороженных растворов в стекловидное состояние T_g' для лиофилируемых препаратов составляет от -15 до -30°C , а в присутствии растворимых углеводов, таких как, например, трегалоза, температуры перехода в стекловидное состояние составляют в пределах от -20 до -30°C .

Способ лиофилизации штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, описанный в примере 3, в присутствии криозащитных агентов, выбранных из растворимых углеводов, а в частности трегалозы, характеризуется проведением стадии замораживания при температуре ниже -30°C , с последующей сушкой при температуре ниже 100°C . Такой способ позволяет получить штамм LMG S-26420 в лиофильной форме, характеризующейся сохранением своих биологических свойств.

В частности, способ лиофилизации штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, описанный в настоящем изобретении, в присутствии трегалозы обеспечивает сохранение жизнеспособности клеток более чем на 30%, а в частности от 30 до 60%, по сравнению с жизнеспособностью клеток до лиофилизации.

Описанные лиофильные композиции штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 содержат растворимые углеводы, такие как трегалоза и маннит; и такие углеводы могут быть добавлены в содержащие трегалозу лиофильные препараты, если требуется высокая лиофильная масса, а в частности при получении препаратов с низкой дозой пробиотического штамма.

Растворы, содержащие лиофилизированный штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут включать осмолиты, выбранные из группы, состоящей из бетаина, саркозина, глицерина, эритрита; соли, выбранные из группы, состоящей из ацетатов, формиатов или солей аммония, и эти растворы могут быть использованы для поддержания pH от 4 до 8 в процессе лиофилизации.

Лиофильный штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 является стабильным при температуре 4°C в течение более чем 3 месяцев. В конкретном аспекте *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 сохраняет свою клеточную жизнеспособность более, чем 70% в течение 6 месяцев при температуре 4°C , а его активность в воде составляет ниже 0,6%.

Следовательно, лиофильный продукт может быть приготовлен в большом количестве и может храниться в виде препарата композиций в твердой или суспензированной форме в различных дозах пробиотика.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, к питательным препаратам или к пищевым продуктам, содержащим различные количества штамма LMG S-26420 в лиофильной форме в пределах от 20 до 2500 мг. Эти композиции характеризуются тем, что они содержат живые клетки LMG S-26420 в количестве от 1×10^9 до 1×10^{11} на грамм лиофильного продукта.

Препараты могут быть приготовлены в форме, подходящей для перорального введения, например в форме саше, таблеток, капсул или жидких суспензий.

Композиции в форме таблеток или капсул могут содержать штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в количестве от 20 до 800 мг, а композиции в форме саше для жидкой суспензии могут содержать штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в количестве от 20 мг до 10 г. Фармацевтические или питательные композиции могут содержать *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в количестве приблизительно от 1×10^9 до 1×10^{11} единиц клеток.

Фармацевтические, питательные или пищевые композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут, но необязательно, включать среди прочих пребиотики, выбранные из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов, инулинов, галакто-олигосахаридов, ксило-олигосахаридов, изомальто-олигосахаридов, резистентного декстрина, полидекстрозы, арабиногалактанов, резистентного крахмала, декстранов, гуаровой камеди; аминокислот; белков; антиоксидантов; витаминов, выбранных из группы, включающей витамины комплексов E и B, вместе с фармацевтически приемлемыми солями, используемыми для приготовления нужной формы.

Фармацевтические, питательные или пищевые композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут также включать и другие бактерии, способные превращать LA в CLA, а в частности бактерии, принадлежащие к роду *Bifidobacterium*. Эти композиции способствуют увеличению степени превращения LA в CLA и обеспечивают баланс бактериальной флоры кишечника.

Композиции в форме саше получают путем смешивания штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в виде лиофильных продуктов с выбранными наполнителями, такими как, например, олигосахариды, выбранные из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов, инулинов, галакто-олигосахаридов, ксило-олигосахаридов, изомальто-олигосахаридов, и отдушек, которые были предварительно просеяны. Затем гомогенную смесь распределяют по саше.

Лиофильная форма может быть подвергнута измельчению или гранулированию, а затем добавлена к фармацевтическим наполнителям, выбранным для приготовления нужных твердых форм.

Композиции в форме таблеток могут содержать разбавители, лиганды, дезинтеграторы, лубриканты и агенты, уменьшающие скольжение, и такие композиции получают методами, известными специалистам.

Композиции могут содержать, но необязательно, консерванты, антиоксиданты, забуферивающие агенты, красители, ароматизаторы и подсластители.

Композиции согласно изобретению, содержащие штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, являются стабильными при температуре 4 и 25°C в течение 1, 3 и 6 месяцев с полным восстановлением живых клеток.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтических, питательных или пищевых композиций, содержащих штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 для лечения и профилактики патологий и/или физиологических состояний, при которых пробиотик дает благоприятный эффект. Эти композиции могут быть использованы для профилактики и лечения патологий и/или физиологических состояний, ассоциированных с дефицитом CLA, например воспалительных заболеваний кишечника, диареи и воспаления толстой кишки; для увеличения массы тела; для повышения термогенеза; для защиты от окислительного стресса; для предупреждения образования опухолей; и для лечения и профилактики аутоиммунных заболеваний, диабета и атеросклероза.

Композиции, содержащие штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть использованы для лечения и профилактики всех расстройств или патологий, ассоциированных с микробным дисбалансом.

Композиции, содержащие штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, могут быть также использованы в качестве пищевой добавки во все диетические блюда, не содержащие мясных или молочных продуктов, для достижения концентраций CLA, полезных для человека.

Примеры

В примерах описан штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, точно соответствующий штамму, депонированному в Бельгийской Объединенной коллекции микроорганизмов ВССМ/бактерий LMG, Микробиологической лаборатории Университета Гента, где была подтверждена чистота и жизнеспособность штамма, зарегистрированного под номером LMG S-26420. В частности, в примерах приводится характеристика штамма LMG S-26420 и описание его способности превращать LA в CLA; способа его продуцирования в промышленном масштабе; и композиций, содержащих этот штамм.

Пример 1.

Определение способности штамма превращать линолевую кислоту (LA) в линолеву кислоту с сопряженными связями (CLA).

Для определения способности штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращать LA в CLA были оценены условия, при которых инокулят был получен в присутствии LA для стимуляции предварительно адаптированных бактериальных клеток, и условия в отсутствие LA.

а) Определение методом Ogawa.

Количественное определение способности *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 превращать LA в CLA проводили методом Ogawa, описанным в Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 1246.

Этот метод основан на использовании инокулята штамма в культуральной среде MRS® (Man, Rogosa, Sharpe), содержащей смесь пептонов, 18 г/л; дрожжевого экстракта, 4 г/л; глюкозы, 20 г/л; твина-80, 1 мл/л; фосфата калия, 2 г/л; трицитрата аммония, 2 г/л; безводного ацетата натрия, 3 г/л; гептагидрата-сульфата магния, 0,2 г/л; безводного сульфата магния, 0,034 г/л; агара 12 г/л.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в концентрации 1% инокулировали в 15 мл MRS® с LA в концентрации от 0,01 до 0,4 мг/мл, и растворы выдерживали при температуре 37°C в течение 3 дней при легком перемешивании. Культуры центрифугировали и супернатант удаляли. Осадок промывали стерильной водой, и клеточную массу приблизительно в 20 мг ресуспендировали с 1 мл раствора фосфатно-калиевого буфера, 100 мМ при pH 6,5, после чего к клеточной суспензии добавляли 5 мг LA в комплексе с бычьим альбумином (BSA) в отношении, соответствующем 0,2 мг BSA/мг LA. После этого культуры инкубировали в течение 48 и 72 ч, а затем центрифугировали для удаления супернатанта. Клетки ресуспендировали в воде и определяли концентрацию CLA спектрофотометрическим методом Баретта, описанным в Appl. Environment Microbiol. 73(7), 2333, (2007). Этот метод включает экстракцию фракции жирной кислоты путем добавления 2 мл изопропанола к 1 мл образца. Растворы интенсивно перемешивали, оставляли на 3 мин, а затем добавляли 1,5 мл гексана. Органические фазы отделяли и дегидратировали безводным сульфатом натрия, а затем определяли количество CLA путем спектрофото-

метрического считывания на 233 нм. Концентрации определяли по калибровочной кривой, построенной по различным концентрациям изомера CLA с9-t11, на одной и той же длине волны.

В табл. 1 указаны проценты превращения LA с CLA штаммом *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, где предварительное инкубирование штамма осуществляли при различных концентрациях LA, а инкубирование промытых клеток осуществляли с использованием 5 мг/мл LA. В табл. 1 показано, что в данных условиях процент превращения LA в CLA составляет от 1 до 7%.

Таблица 1

Концентрация LA (мг/мл)	Время инкубирования клеток (ч)	Температура инкубирования клеток (°C)	Концентрация CLA (мг/мл)	Процент (%) превращения LA в CLA
0,01	48	30	0,083	2
0,05	48	30	0,075	2
0,1	48	30	0,067	1
0,2	48	30	0,041	1
0,3	48	30	0,045	1
0,4	48	30	0,104	2
0,01	72	37	0,204	4
0,05	72	37	0,273	5
0,1	72	37	0,097	2
0,2	72	37	0,349	7
0,3	72	37	0,282	6
0,4	72	37	0,085	6

В условиях, указанных в табл. 2, CLA не присутствовала в супернатанте.

В табл. 2 представлены результаты превращения LA в CLA. Предварительное инкубирование осуществляли с LA в концентрации 0,05 мг/мл, и промытую клеточную массу инкубировали при различных концентрациях LA. Затем определяли присутствие CLA в супернатанте и в клеточном осадке.

Таблица 2

Концентрация LA (мг/мл)	Время инкубирования клеток (ч)	Температура инкубирования клеток (°С)	Образец	Концентрация CLA (мг/мл)	Процент (%) превращения LA в CLA
0,05	72	37	Клетки	-	-
0,05	72	37	Супернатант	0,013	25
0,1	72	37	Клетки		-
0,1	72	37	Супернатант	0,004	4
0,2	72	37	Клетки		-
0,2	72	37	Супернатант	-	-
0,3	72	37	Клетки	-	-
0,3	72	37	Супернатант	-	-
0,4	72	37	Клетки	0,007	2
0,4	72	37	Supernat	0,005	1
0,5	72	37	Клетки	0,007	1
0,5	72	37	Supernat	0.003	1
1	72	37	Клетки	0,025	3
1	72	37	Supernat	-	-
			,		
2	72	37	Клетки	0,042	2
2	72	37	Супернатант	0,011	1
3	72	37	Клетки	0,059	2
3	72	37	Супернатант	0,017	1
4	72	37	Клетки	0,077	2
4	72	37	Супернатант	0,0043	1

б) Определение методом Liu

Метод Liu был описан в Biomed. Biotechnol. 12811, 923 (2011).

В табл. 3 представлены данные, относящиеся к превращению LA в CLA штаммом *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 и полученные методом, описанным Liu P. и др. Biomed. Biotech. 12811, 923, 2011.

Этот метод основан на определении количества CLA в супернатанте культур в среде MRS®, содержащей LA в различных концентрациях от 0,05 до 0,5 мг/мл. Культуры инкубировали в течение 24 и 96 ч и при температуре 30 и 37°C. Количество CLA, полученной путем превращения из LA, определяли методом Баретта, описанным в примере 1.а).

Таблица 3

Концентрация ЛА (мг/мл)	Время инкубировани я клеток (часы)	Температура инкубировани я клеток (°С)	Концентрация СЛА (мг/мл)	Процент (%) превращения ЛА в СЛА
0,00	24	30	0,001	–
0,05	24	30	0,005	9
0,1	24	30	0,005	5
0,2	24	30	0,005	2
0,3	24	30	0,006	2
0,4	24	30	0,006	2
0,5	24	30	0,006	1
0,00	96	30	0,001	–
0,05	96	30	0,006	12
0,1	96	30	0,005	5
0,2	96	30	0,005	3
0,3	96	30	0,006	2
0,4	96	30	0,006	1
0,5	96	30	0,006	1
0,00	24	37	0,001	–
0,05	24	37	0,004	8
0,1	24	37	0,005	5
0,2	24	37	0,005	2
0,3	24	37	0,005	2
0,4	24	37	0,006	1
0,5	24	37	0,006	1
0,00	96	37	0,001	–
0,05	96	37	0,005	10
0,1	96	37	0,006	6
0,2	96	37	0,006	3
0,3	96	37	0,007	2
0,4	96	37	0,006	2
0,5	96	37	0,008	2

с) Определение хроматографическим методом (ЖХВД).

Хроматографический метод позволяет определить присутствие геометрических изомеров СЛА, изомера с9-t11, изомера транс10-цис12 и изомера транс9-транс11 в клеточных суспензиях и в супернатантах культур методом, описанным в а) и б) и в табл. 2 и 3.

Образцы метилировали как описано Kramer J. и др. в Am. J. Clin. 79, 1137 S 2004, и полученные метиловые сложные эфиры разделяли с помощью хроматографии высокого давления на ионах серебра (ЖХВД). Изомеры СЛА разделяли на трех последовательно соединенных колонках CHromSpher Lipid размером 4,6 мм×250 мм с частицами размером 5 мкм. Изомеры элюировали раствором гексана-ацетонитрила:99-1 и последовательно детектировали на диодно-матричном детекторе и УФ-детекторе на 234 нм. Количественную оценку осуществляли с использованием растворов с известными концентра-

циями изомеров CLA.

В табл. 4а проиллюстрировано определение изомеров CLA в образцах осадка, полученных после предварительного инкубирования культур с LA в концентрации 0,05 мг/мл и инкубирования промытых клеток при различных концентрациях LA при 37°C и времени инкубирования 72 ч, как описано в (а), методом Ogawa.

Таблица 4а

Концентрация LA (мг/мл)	Изомер CLA t9-t11 (мкг/г)	Изомер CLA c10-t12 (мкг/г)	Изомер CLA c9-t11 (мкг/г)	Изомеры (t9-t11 и c9-t11)* (%)	Общий процент превращения (%)
0,05	1,39	2,75	2,07	3,46	14,8
0,01	1,56	3,50	3,07	4,63	0,2
0,4	1,21	2,78	2,40	3,61	0,2

* изомеры с биологической активностью

В табл. 4б представлена концентрация изомеров CLA в образцах супернатантов культур, инкубированных с LA в различных концентрациях, как описано в (б), методом Liu.

Таблица 4б

Концентрация LA (мг/мл)	Изомер CLA t9-t11 (мкг/г)	Изомер CLA c10-t12 (мкг/г)	Изомер c9-t11 (мкг/г)	Изомер CLA (t9-t11 и c9-t11)* (мкг/г)	Изомеры (t9-t11 и c9-t11)* (%)	Общий процент превращения (%)
0,05 (24 ч)	1,81	5,07	3,30	44,16	46,76	25,9
0,05 (96 ч)	2,45	6,33	5,06	42,26	46,67	35,5
0,2 (96 ч)	1,74	5,64	5,04	46,15	46,15	7,3
0,5 (96 ч)	1,95	5,80	5,22	7,17	44,67	3,2

*изомеры с биологической активностью

Пример 2

Способ ферментации для получения штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

Ферментацию осуществляли в ферментере Сарториуса. Инокулят штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в концентрации 1%, соответствующей 40 мл, культивировали в 4 л среды MRS® при температуре 37°C в течение 8 ч.

Клеточную массу, полученную различными способами ферментации, концентрировали путем центрифугирования и промывали стерильной водой. Оптическую плотность водной суспензии клеточной массы определяли спектрофотометрическим методом на 625 нм и определяли число колониеобразующих единиц (КОЕ) путем подсчета числа клеток на планшете в десятичных цифрах.

Некоторые препараты получали с использованием различных параметров ферментации для определения наилучших условий для роста бактериального штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

В табл. 5 указаны параметры, относящиеся к ферментации при различных величинах давления диоксида углерода, скорости перемешивания и pH. В табл. 5 также представлены результаты, полученные путем измерения оптической плотности и числа КОЕ в биомассе через 8 ч после окончания ферментации.

Таблица 5

Параметры ферментации	Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4	Препарат 5	Препарат 6
Культуральная среда	MRS®	MRS®	MRS®	MRS®	MRS®	MRS®+трегалоза 1%
pH	п.с.	п.с.	п.с.	5,5	5,5	5,5
P-CO2 (бар)	0,8 бар -30 мин.	0,8 бар -30мин.	1 бар -60мин.	1 бар -60мин.	п.с.	0.8 бар -45мин.
Скорость перемешивания (об/мин)	100	150	150	150	150	150
Масса биомассы (г)	40	40	32	35	47	62
OD 625 нм - T0	3,50	0,075	0,041	0,045	0,036	0,04
OD 625 нм - 8 часов.	0,087	1,78	1,406	1,63	1,553	1,50
КОЕ /мл - T0	3,50E+06	2,50E+07	6,30E+07	3,30E+07	3,00E+07	1,75E+07
КОЕ /мл - 8 часов	2,30E+09	1,10E+09	1,90E+09	2,20E+09	2,60E+09	1,05E+09

п.с: не корректировали

Число КОЕ *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 по окончании культивирования составляло от $1,9 \times 10^9$ до $2,6 \times 10^9$ на миллилитр культуры, а количество полученной биомассы составляло от 8 до 16 г/л культуры.

Измерение КОЕ осуществляли на чашках Петри путем высевания клеточной массы методом серийного разведения и подсчета колоний микроорганизмов.

Клеточные массы могут храниться при температуре ниже 0°C, либо они могут быть сразу лиофилизованы для их хранения в твердой форме, либо они могут быть сразу использованы для приготовления фармацевтических/питательных препаратов.

Пример 3.

Получение штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в лиофильной форме.

Продукт, полученный из препарата, описанного в примере 2 (препарата 6), лиофилизовали.

Для оценки влияния криозащитного агента на лиофилизацию *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, способы лиофилизации проводили в присутствии циклодекстринов, трегалозы и маннита.

Клеточный осадок суспендировали в воде и добавляли циклодекстрины в количестве 10% (давление/объем).

Раствор разделяли на три части:

раствор А: циклодекстрины 10% (мас./об.);

раствор В: циклодекстрины 10% (мас./об.)+трегалоза 20% (мас./об.);

раствор С: циклодекстрины 10% (мас./об.)+маннит 15% (мас./об.).

В табл. 6 указаны параметры лиофилизации для раствора А и В.

Таблица 6

Стадии способа лиофилизации (I)	Параметры
Замораживание	-50°C, $v=2^\circ\text{C}/\text{мин}$, -50°C × 120 мин
Первая сушка	-50°C × 15 мин, -30°C, $v=0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$, -30°C × 300 мин, P=100 мТорр
Вторая сушка	30°C, $v=0,16^\circ\text{C}/\text{мин}$, 30°C × 480 мин, P=100 мТорр
Общее время	14 часов

В табл. 7 указаны параметры лиофилизации для растворов С.

Таблица 7

Стадии способа лиофилизации (I)	Параметры
Замораживание	-60°C × 120 мин
Отжиг	-10°C, v=0,55°C/мин -10°C × 240 мин -50°C × 120 мин
Первая сушка	-18°C, v=0,16°C/мин -18°C × 600 мин P=120 мТорр
Вторая сушка	25°C, v=0,07°C/мин P=50 мТорр

Полученный лиофильный штамм *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 хранили в бутылках или в саше при 4°C.

Пример 4.

Определение температуры перехода в стекловидное состояние T_g, T'_g.

Температуры перехода в стекловидное состояние T_g и T'_g растворов А и В до лиофилизации определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии на ДСК-устройстве Даймонда путем проведения циклов замораживания/нагревания как показано в табл. 8.

Таблица 8

Стадия	Температура 1 (°C)	Температура 2 (°C)	Скорость (°C/мин)
1	25	-60	10
2	-60	25	40
3	25	100	10
4	100	-50	50
5	-50	170	40

Цикл, указанный в табл. 9 проводили для растворов С.

Таблица 9

Стадия	Температура 1 (°C)	Температура 2 (°C)	Скорость (°C/мин)
1	25	-60	10
2	-60	-10	40
3	-10	-10	Постоянная в течение 120 минут
4	-10	-60	40
5	-60	25	40

Величины температур перехода в стекловидное состояние T_g для растворов и замороженных водных растворов, и T'_g для растворов А, В и С, подвергаемых лиофилизации, указаны в табл. 10.

Таблица 10

Лиофилизация IMG S-26420	Препарат	T'g (°C)	Tg (°C)
Растворы А=циклодекстрины 10% (давление/объем)	А-1	-12,25	148,55
	А-2	-12,75	140,81
	А-3	-13,05	144,44
В=циклодекстрины 10% (давление/объем) + трегалоза 20% (давление/объем)	В-1	-26,50	112,00
	В-2	-26,63	114,64
	В-3	-26,54	117,54
	В-4	-26,75	112,45
	В-5	-26,54	114,40
	В-6	-30,58	111,93
	В-7	-34,76	116,629
	В-8	-27,96	111,77
	В-9	-27,50	118,40
С=циклодекстрины 10% (давление/объем) + маннит 15%	С-1	T'g ¹ : -36,8 T'g ² : -28 T'g ³ : -14,8	н.о.
	С-2	-28,4	106,00

Пример 5.

Характеризация лиофильного штамма *Lactobacillus paracasei* IMG S-26420.

а) Определение жизнеспособности штамма

Для определения выхода и жизнеспособности штамма *Lactobacillus paracasei* IMG S-26420 после лиофилизации растворов А, В и С, полученных как описано в примере 3, вычисляли КОЕ штамма до и после лиофилизации путем подсчета числа микроорганизмов на чашке Петри. Эту процедуру подсчета осуществляли с использованием лиофильного продукта, соответствующего количеству 0,5 г, который был суспендирован в 49,5 г буфера для разведения (MRS®) и подвергнут серийному разведению до уровня, подходящего для такого подсчета. Затем разведенный продукт осаждали на чашке Петри, содержащей 20 мл агаровой среды MRS®, предварительно стерилизованной в автоклаве и инкубированной при 37°C в течение 72 ч в анаэробных условиях.

Оценку проводили для множества лиофильных препаратов, полученных из растворов А, В и С, и результаты представлены в табл. 11.

Таблица 11

Лиофилизация LMG S-26420	Препарат	До лиофилизации КОЕ/мл ± ср. кв.откл.	После лиофилизации (T ₀) КОЕ/г ± ср. кв.откл.	Процент выхода (%) после лиофилизации
Раствор А=циклодекстрины 10% (масс./об.)	А-1	4,6 ± 0,6×10 ¹⁰	5,6 ± 0,4×10 ¹⁰	13,9 ± 0,9
	А-2	4,0 ± 0,5×10 ¹⁰	3,4 ± 0,2×10 ¹⁰	16,6 ± 1,1
	А-3	2,8 ± 0,5×10 ¹⁰	3,3 ± 0,5×10 ¹⁰	15,8 ± 2,9
В=циклодекстрины 10% (масс./об.) +трегалоза 20% (масс./об.)	В-1	3,2 ± 0,5×10 ¹⁰	2,9 ± 0,7×10 ¹⁰	26,2 ± 6,5
	В-2	4,4 ± 0,1×10 ¹⁰	3,3 ± 0,3×10 ¹⁰	22,8 ± 1,9
	В-3	3,3 ± 0,1×10 ¹⁰	6,3 ± 0,3×10 ¹⁰	57 ± 27,0
	В-4	2,2 ± 0,8×10 ¹⁰	3,9 ± 0,3×10 ¹⁰	45,1 ± 2,7
	В-5	2,8 ± 0,2×10 ¹⁰	4,6 ± 0,9×10 ¹⁰	41,7 ± 7,5
	В-6	3,6 ± 0,1×10 ¹⁰	3,7 ± 0,5×10 ¹⁰	23,3 ± 2,9
	В-7	3,1 ± 0,9×10 ¹⁰	2,9 ± 0,8×10 ¹⁰	21,9 ± 6,0
	В-8	5,5 ± 0,7×10 ¹⁰	1,4 ± 0,8×10 ¹⁰	35,8 ± 1,4
	В-9	4,3 ± 0,9×10 ¹⁰	3,7 ± 0,8×10 ¹⁰	22,6 ± 2,1
С=циклодекстрины 10% (давление/объем)) +маннит 15%	С-1	7,3 ± 2, ×10 ¹⁰	<1×10 ¹⁰	13,9 ± 0,9
	С-2	3,6 ± 0,5×10 ¹⁰	2,3 ± 0,8×10 ¹⁰	9,56 ± 4,0

В табл. 11 подтвержден эффект трегалозы в процессе лиофилизации, дающей более, чем 30% выход КОЕ.

Маннит может быть добавлен к трегалозе, если желательно получить большую лиофильную массу, а в частности, небольшие дозы *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

Пример 6.

Определение активности в воде и потери массы путем сушки лиофильного *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

а) Определение активности в воде (a_w).

Определение активности в воде соответствует определению наличия свободной воды в лиофильных препаратах *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 для растворов А, В и С, полученных в примере 3. Такое определение осуществляли путем помещения образца приблизительно в 1 г каждого лиофильного продукта в устройство Aqualab VSA Decagon, которое позволяет измерять активность образца в воде на диэлектрическом детекторе влажности и непосредственно получить величину, прямо пропорциональную молям воды на моли всего образца, и полученные величины представлены в табл. 12.

Таблица 12

Компоненты лиофилизации LMG S-26420	Препарат No.	a_w (активность в воде)
Раствор А=циклодекстрины 10% (масс./об.)	А-1	н.о.
	А-2	н.о.
	А-3	0,358
В=циклодекстрины 10% (масс./об.)+трегалоза 20% (масс./об.)	В-1	н.о.
	В-2	н.о.
	В-3	0,363
	В-4	0,153
	В-5	0,100
	В-6	0,120
	В-7	0,136
	В-8	0,166
	В-9	0,087
Раствор С=циклодекстрины 10% (масс./об.)+маннит 15% (масс./об.)	С-1	0,174
	С-2	0,134

Все полученные лиофильные продукты имеют величины a_w ниже 0,6, что подтверждает то, что эти продукты могут храниться в течение длительного периода времени без риска их разложения.

б) Определение потери содержания воды (LOD).

Содержание влаги в лиофильных образцах вычисляли по термошкале Метлера, и величины представлены в табл. 13.

Таблица 13

Компоненты лиофилизации LMG S-26420	Препарат No.	Процент влажности LOD (%)
Раствор А=циклодекстрины 10% (масс./об.)	А-1	3,61
	А-2	2,58
	А-3	3,9
В=циклодекстрины 10% (масс./об.) + трегалоза 20% (масс./об.)	В-1	4,01
	В-2	4,24
	В-3	4,90
	В-4	3,39
	В-5	2,94
	В-6	2,85
	В-7	3,05
	В-8	3,21
	В-9	2,41
Раствор С=циклодекстрины 10% (масс./об.)+маннит 15% (масс./об.)	С-1	2,14

Пример 7.

Определение стабильности лиофильных препаратов штамма *Lactobacillus paracasei* IMG S-26420.

Лиофильные препараты штамма *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 хранили при 4°C и определяли их стабильность путем вычисления уровня бактерий и активности в воде (a_w) (T0) на время 0 и через 3 и 6 месяцев. Полученные результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

Препарат	КОЕ/г ± ср. кв.откл.			Выход КОЕ % T6/T0	a_w (активнос ть в воде) T0	a_w (активнос ть в воде) T6
	T0	T3	T6			
A-1	3,4±0,2 ×10 ¹⁰	1,3±0,2×1 0 ¹⁰	9,8±5,7×1 0 ⁴	<10%		
A-2	3,5±0,6× 10 ¹⁰	6,4±1,5×1 0 ⁹	<1,78×10 ²	<10%		
A-3	2,9±0,7× 10 ¹⁰	7,1±2,5×1 0 ⁹	-			
B-1	2,9±0,7× 10 ¹⁰	7,1±2,5×1 0 ⁹	-			
B-2	3,3±0,3 ×10 ¹⁰	1,2±0,1×1 0 ¹⁰	-		0,153	0,276
B-3	6,3±0,2 ×10 ¹⁰	1,9±0,2×1 0 ¹⁰	1,8±0,1×1 0 ¹⁰	27,7±1,0	0,100	0,163
B-4	3,9±0,2× 10 ¹⁰	2,3±0,6×1 0 ¹⁰	2,9±0,7×1 0 ¹⁰	75,0±19,2	0,120	0,313
B-5	4,6±0,9× 10 ¹⁰	4,9±0,4×1 0 ¹⁰	-		0,136	0,279
B-6	3,7±0,5× 10 ¹⁰	4,2±0,3 ×10 ¹⁰	5,0±0,6×1 0 ¹⁰	136,2±14,8	0,143	0,182
B-7	2,9±0,8× 10 ¹⁰	1,9±0,3×1 0 ¹⁰	2,6±2,1×1 0 ¹⁰	91,1±17,9	0,087	-

В таблице показано, что лиофильные продукты, полученные в присутствии трегалозы, являются стабильными при 4°C в течение 6 месяцев и что их активность в воде (a_w) всегда ниже 0,6.

Пример 8.

Композиции в саше, содержащие *Lactobacillus paracasei* IMG S-26420.

Препараты в саше содержат лиофильный продукт, полученный как описано в примере 2 (препараты В) в количестве 800 и 500 мг, соответствующем приблизительно 3×10^{10} и 2×10^{10} живых клеток *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

Лиофильный продукт смешивали с наполнителями, которые были предварительно просеяны, и гомогенную смесь распределяли по саше. Комбинированные композиции представлены в табл. 15.

Одна из описанных композиций содержит инулин, другая содержит ксило-олигосахарид, а остальные содержат смесь фрукто-олигосахаридов, образованных цепью молекул фруктозы, связанных с молекулой глюкозы (Actilight 950P).

Таблица 15

Компонент	Масса композиции 1 (мг)	Масса композиции 2 (мг)	Масса композиции 3 (мг)	Масса композиции 4 (мг)
Лиофильный <i>Lactobacillus paracasei</i> LMG S-26420	800	800	500	500
Инулин	3200			
Ксило-олигосахарид		3200	506	506
Отдушка (маракуйя)			44	44
Двуокись кремния			10	10
Астаксантин				160
Actilight 950P			2940	1720
Общая масса	4000	4000	4000	4000

Композиции могут содержать витамины, например витамин Е, витамин В1, витамин В2, витамин В16. Композиции в саше могут быть суспендированы в водных растворах или в полутвердых пищевых продуктах.

Пример 9.

Композиции, содержащие *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 в таблетках.

Препараты в таблетках, содержащие лиофильный продукт в количестве 250 мг, соответствующем приблизительно 1×10^{10} живых клеток *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, получали путем смешивания лиофильного препарата с наполнителями, предварительно просеянными на сите 800 мкм. Затем смесь спрессовывали в прессовальной машине Ронши или на аналогичном устройстве путем сообщения силы сжатия приблизительно 13 кН.

Общий состав таблеток указан в табл. 16.

Таблица 16

Компоненты	Количество (мг)
<i>Lactobacillus paracasei</i> LMG S-26420	250 (1×10^{10} КОЕ)
Изомальто	278,0
Кроскармелоза	9,9
Тальк	5,5
Двуокись кремния	3,8
Стеарат магния	2,8
Общая масса	550

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Lactobacillus paracasei* BCCM LMG S-26420, способный превращать линолевую кислоту в конъюгированную линолевую кислоту, где выход конъюгированной линолевой кислоты составляет 30-50%.

2. Штамм *Lactobacillus paracasei* BCCM LMG S-26420 по п.1, отличающийся тем, что он превращает линолевую кислоту в изомеры с противораковой активностью конъюгированной линолевой кислоты *cis9-trans11* и *trans9-trans11*, где сумма этих изомеров в процентном соотношении составляет более чем 30% по сравнению с другими изомерами.

3. Способ получения бактериальной биомассы штамма *Lactobacillus paracasei* BCCM LMG S-26420 по п.1, отличающийся тем, что он включает следующие стадии:

инокуляция штамма *Lactobacillus paracasei* BCCM LMG S-26420 в процентах по объему от 0,1 до 10% в подходящую культуральную среду при температуре от 30 до 37°C и при pH от 4,5 до 7,5 и культивирование в течение 6-15 ч;

отделение бактериальной массы от культурального бульона путем центрифугирования.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию лиофилизации в присут-

ствии криозащитных агентов, выбранных из растворимых углеводов.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что криозащитный агент представляет собой трегалозу.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая клетки бактериального штамма *Lactobacillus paracasei* ВССМ LMG S-26420 в количестве от 1×10^8 до 5×10^{11} КОЕ в комбинации с приемлемыми наполнителями, в форме таблеток, гранул для саше, капсул или жидких суспензий.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, отличающаяся тем, что содержит пребиотики, витамины и минеральные соли.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, отличающаяся тем, что пребиотики выбраны из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов, инулинов, галакто-олигосахаридов, ксило-олигосахаридов, изо-мальто-олигосахаридов и витаминов, выбранных из группы, включающей витамины Е и В.

9. Фармацевтическая композиция по п.6, отличающаяся тем, что дополнительно содержит бифидобактерии.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* ВССМ LMG S-26420 для лечения и/или профилактики патологий или заболеваний, ассоциированных с дефицитом конъюгированной линолевой кислоты.

11. Применение фармацевтической композиции по п.6 для лечения или профилактики воспалительных патологий кишечника.

12. Фармацевтическая композиция по п.7, отличающаяся тем, что дополнительно содержит лактобациллы, принадлежащие к различным штаммам, и/или бифидобактерии, которые могут быть использованы для лечения заболеваний, ассоциированных с бактериальным дисбиозом.

13. Пробиотическая композиция, содержащая клетки бактериального штамма *Lactobacillus paracasei* ВССМ LMG S-26420 в количестве от 1×10^8 до 5×10^{11} КОЕ в комбинации с приемлемыми наполнителями, в форме таблеток, гранул для саше, капсул или жидких суспензий.

14. Пробиотическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что содержит пребиотики, витамины и минеральные соли.

15. Пробиотическая композиция по п.14, отличающаяся тем, что пребиотики выбраны из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов, инулинов, галакто-олигосахаридов, ксило-олигосахаридов, изо-мальто-олигосахаридов и витаминов, выбранных из группы, включающей витамины Е и В.

16. Пробиотическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что дополнительно содержит бифидобактерии.

17. Пробиотическая композиция, содержащая бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* ВССМ LMG S-26420 для профилактики патологий или заболеваний, ассоциированных с дефицитом конъюгированной линолевой кислоты.

18. Применение пробиотической композиции по п.17 для профилактики воспалительных патологий кишечника.

19. Пробиотическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что дополнительно содержит лактобациллы, принадлежащие к различным штаммам, и/или бифидобактерии, которые могут быть использованы для лечения заболеваний, ассоциированных с бактериальным дисбиозом.

