

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039591**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.15

(51) Int. Cl. *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891064

(22) Дата подачи заявки
2016.10.28

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОСУШЕННЫХ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК**

(31) **2015-214299**

(56) JP-A-2013535222
JP-B2-3504365
JP-A-2010004787
JP-A-58107181

(32) **2015.10.30**

(33) **JP**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/JP2016/082125**

(87) **WO 2017/073752 2017.05.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КАБУСИКИ КАЙСЯ ЯКУЛТ ХОНСА
(JP)**

(72) Изобретатель:
**Ито Масахико, Симура Кисаку,
Сирота Сатору, Касаха Кеико, Мотеки
Ясухиро, Мацуи Акихиса, Миида
Сатоси (JP)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к дисперсионной среде для сушки микробных клеток, представляющей собой водный раствор, содержащий глутамат натрия и трегалозу в качестве протективных агентов, аскорбат натрия в качестве антиоксиданта и цитрат натрия в качестве хелатообразующего агента. Целью изобретения также является разработка способа получения осушенных микробных клеток с высокой степенью жизнеспособности после их длительного хранения при высокой температуре. Способ получения осушенных микробных клеток, который позволяет достичь вышеупомянутой цели, отличается тем, что микробные клетки суспендируют в дисперсионной среде, содержащей протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент, с последующей сушкой полученной суспензии.

B1

039591

039591

B1

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения осушенных микробных клеток, а более конкретно, к способу получения осушенных микробных клеток с высокой степенью жизнеспособности после длительного хранения при высокой температуре.

Предпосылки создания изобретения

Молочнокислые бактерии, известные как кишечные бактерии, широко используются, главным образом, для приготовления молочных продуктов, таких как йогурт и сыр, а также для приготовления пищевых продуктов, напитков и т.п. с использованием осушенных молочнокислых бактерий, которые все чаще применяются в последнее время. При этом для достижения эффекта молочнокислых бактерий желательнее использовать живые микробные клетки, однако при проведении стадии получения осушенных микробных клеток эти клетки часто разрушаются и погибают, а поэтому достаточно трудно получить жизнеспособные клетки в необходимом количестве.

Кроме того, известно, что для снижения степени повреждения или гибели микробных клеток большое значение имеет компонент, содержащийся в дисперсионной среде, используемой при сушке микробных клеток, и в настоящем изобретении описано, например, добавление глутамата натрия (PTL 1) или трегалозы (NPL 1) в дисперсионную среду или использование комбинации этих компонентов (PTL 2).

С другой стороны, при рассмотрении аспекта распределения осушенных микробных клеток необходимо получить осушенные клетки, степень выживаемости которых поддерживается на высоком уровне в течение длительного периода времени даже при хранении клеток в течение длительного периода времени при нормальной температуре (20-40°C). Обычно считается, что по мере повышения температуры разложение продукта во время хранения ускоряется даже в пределах нормальных температур, а в частности, важное значение имеет сохранение качества продукта при высокой температуре (30-40°C).

Список цитируемой литературы

Патентная литература.

PTL 1: Японский патент No. 3504365.

PTL 2: JP-A-2010-4787.

Непатентная литература.

NPL 1: G.L. DE ANTONI et al., "Trehalose, a Cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*", *Cryobiology* 26, p. 149-153, 1989.

Сущность изобретения

Техническая проблема

В соответствии с этим целью настоящего изобретения является разработка способа получения осушенных микробных клеток с высокой степенью жизнеспособности после длительного хранения при высокой температуре.

Решение проблемы

Авторами настоящего изобретения были проведены интенсивные исследования для достижения вышеупомянутой цели, в результате чего авторами было обнаружено, что степень выживаемости жизнеспособных клеток после длительного хранения при высокой температуре повышается, если перед сушкой микробных клеток проводят предварительное суспендирование микробных клеток в дисперсионной среде, содержащей комбинацию протективного агента, антиоксиданта и хелатообразующего агента, а затем их сушку, и на этом основано настоящее изобретение.

То есть, настоящее изобретение относится к способу получения осушенных микробных клеток, заключающемуся в суспендировании микробных клеток в дисперсионной среде, содержащей протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент, с последующей сушкой этих клеток.

Кроме того, настоящее изобретение относится к осушенным микробным клеткам, которые были получены путем сушки микробных клеток с использованием дисперсионной среды, содержащей протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент.

Кроме того, настоящее изобретение относится к дисперсионной среде для сушки микробных клеток, содержащей протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент.

Преимущественные эффекты изобретения

В соответствии со способом согласно изобретению были получены осушенные микробные клетки с высокой степенью выживаемости жизнеспособных клеток даже при хранении этих клеток при высокой температуре в течение длительного периода времени. Следовательно, осушенные микробные клетки, полученные способом согласно изобретению, являются превосходными с точки зрения их распределения и хранения.

Описание вариантов осуществления изобретения

Микроорганизмы, из которых получают осушенные микробные клетки способом согласно изобретению, не имеют конкретных ограничений, однако примерами таких как микроорганизмов являются бактерии *Lactobacillus*, такие как *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus yohurti*, *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* подвид *delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus mail*, бифидобактерии, такие как *Bifidobacterium*

bifidum, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium longum*, стрептококковые бактерии, такие как *Streptococcus thermophilus* и *Streptococcus lactis*, лактококковые бактерии, такие как *Lactococcus lactis* подвид *lactis*, *Lactococcus lactis* подвид *cremoris*, *Lactococcus plantarum* и *Lactococcus raffinolactis*, и энтерококковые бактерии, такие как *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, и среди этих бактерий могут быть использованы бактерии одного вида или двух или более видов. Предпочтительными примерами являются бактерии *Lactobacillus*, более предпочтительной является *Lactobacillus casei*, а особенно предпочтительной является *Lactobacillus casei* YIT 9029 (FERM BP-1366, дата депонирования: 1 мая 1981 г., Международный Депозитарий патентованных микроорганизмов, Национальный Институт технологии и анализа (#120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan).

При осуществлении способа согласно изобретению сначала микроорганизм культивируют стандартным методом, а затем клетки собирают, например, на центрифуге де Лавалья или т.п., после чего их промывают, если это необходимо.

Собранные таким образом микробные клетки добавляют в дисперсионную среду, которая представляет собой водный раствор, содержащий протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент (далее эта среда будет называться просто "дисперсионной средой согласно изобретению"), и суспендируют в этой среде, а затем полученную суспензию сушат, в результате чего могут быть получены осушенные микробные клетки-мишени. Растворители для дисперсионной среды не имеют конкретных ограничений, однако, может быть использована, например, питьевая вода, такая как очищенная вода или деионизованная вода. Дисперсионной средой согласно изобретению является дисперсионная среда для сушки микробных клеток, содержащая протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент. Кроме того, предпочтительной дисперсионной средой является дисперсионная среда, состоящая из протективного агента, антиоксиданта и хелатообразующего агента.

Протективный агент, используемый в дисперсионной среде согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений, однако могут быть использованы, например, глутаминовая кислота или ее соль, дисахарид, глицерин, мальтодекстрин, циклодекстрин, порошкообразное сепарированное молоко или т.п., предпочтительно использовать глутаминовую кислоту или ее соль и/или дисахарид, причем предпочтительными примерами соли глутаминовой кислоты являются глутамат натрия и глутамат калия, особенно глутамат натрия. Примерами дисахаридов являются трегалоза, сахароза, лактоза и мальтоза, предпочтительно трегалоза. Кроме того, предпочтительными являются глутамат натрия и/или дисахарид, более предпочтительными являются глутамат натрия и/или трегалоза. Содержание протективного агента в дисперсионной среде согласно изобретению составляет предпочтительно от 1 до 40 мас.% (далее обозначаемое в %), более предпочтительно от 5 до 30%.

Кроме того, антиоксидант, используемый в дисперсионной среде согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений, однако могут быть использованы, например, аскорбиновая кислота или ее соль, витамин Е, катехин, глутатион, астаксантин или т.п., предпочтительными примерами соли аскорбиновой кислоты являются аскорбат натрия и аскорбат кальция, особенно, аскорбат натрия. Содержание антиоксиданта в дисперсионной среде согласно изобретению предпочтительно составляет от 0,01 до 10%, более предпочтительно от 0,05 до 5%.

Кроме того, хелатообразующий агент, используемый в дисперсионной среде согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений, однако могут быть использованы, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), лимонная кислота или ее соль, фитиновая кислота или т.п. Примерами соли лимонной кислоты является, среди прочих, цитрат натрия. Содержание хелатообразующего агента в дисперсионной среде согласно изобретению составляет предпочтительно от 0,1 до 10%, более предпочтительно от 0,5 до 5%.

Кроме того, в качестве дисперсионной среды согласно изобретению предпочтительно использовать водный раствор, содержащий глутамат натрия, трегалозу, аскорбат натрия и цитрат натрия.

Количество микробных клеток в клеточной суспензии, в которой суспендируют микробные клетки в дисперсионной среде согласно изобретению, составляет приблизительно $1,0 \times 10^5$ - $4,0 \times 10^{14}$ к.о.е./мл, более предпочтительно $1,0 \times 10^7$ - $4,0 \times 10^{13}$ к.о.е./мл.

Сушка способом согласно изобретению не имеет конкретных ограничений, и, например, может быть применен известный метод сушки, такой как лиофилизация или сушка распылением, однако для повышения степени выживаемости микробов на стадии сушки предпочтительной является лиофилизация. Примерами условий сушки в способе лиофилизации являются сушка путем заморозки при температуре от -35 до -45°C в течение 6-12 ч, а затем сушка при температуре 12 - 32°C в течение 40-90 ч. Примером лиофилизатора является лиофилизатор TAKARA FREEZE-DRYER TF20-80 TANNIS (TAKARA ATM Ltd.).

Полученные таким образом осушенные микробные клетки (далее называемые "осушенными микробными клетками согласно изобретению") имеют высокую степень выживаемости после длительного хранения при высокой температуре, как показано в упомянутых ниже примерах, в частности, в случае, когда осушенные микробные клетки измельчают на мельнице, а затем измельченные клетки загружают в капсулы (состоящие из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу в обычных атмо-

сферных условиях без дегазирования и капсулы помещают в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (изготовленным компанией Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) и хранят при 35°C в течение 4 недель, то отношение числа жизнеспособных клеток после хранения к числу жизнеспособных клеток в начале хранения (степень выживаемости) составляет 30% или более. Кроме того, в случае, когда осушенные микробные клетки измельчают на мельнице, а затем измельченные клетки загружают в капсулы (состоящие из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу в обычных атмосферных условиях без дегазирования и капсулы помещают в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (изготовленным компанией Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) и хранят в различных условиях, например при 2°C в течение 1 дня, при 35°C в течение 2 дней, при 30°C в течение 6 дней и при 22°C в течение 6 месяцев, при температуре, которая изменялась во время хранения, то степень выживаемости составляет 40% или более.

Осушенные микробные клетки согласно изобретению не обладают высокой плотностью сразу после лиофилизации, а поэтому эти клетки могут быть затем легко измельчены. Кроме того, осушенные микробные клетки обладают хорошей диспергируемостью при их суспендировании в воде, а поэтому лиофилизация этих клеток может быть проведена за короткий период времени. Кроме того, осушенные микробные клетки обладают низкой гигроскопичностью, а поэтому они не образуют агрегатов даже после длительного хранения и могут быть легко транспортированы, а также сохраняют свой внешний вид, цвет, запах и т.п. как и в начале хранения, и являются предпочтительными.

Кроме того, осушенными микробными клетками согласно изобретению являются осушенные микробные клетки, полученные путем сушки микробных клеток с использованием дисперсионной среды, содержащей протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент. Осушенные микробные клетки могут быть использованы для приготовления пищевых продуктов и напитков либо непосредственно, либо путем смешивания с другим пищевым продуктом, обычно добавляемым в пищу. Примерами пищевых продуктов являются мясные полуфабрикаты, такие как окорок и сосиски, рыбные полуфабрикаты, такие как Камабоко (рулет из отварной рыбной пасты) и Чиква (завернутый в трубочку пирог из отварной рыбной пасты), хлеб, кондитерские изделия, масло и ферментированное молоко, такое как йогурт, а примерами напитков являются безалкогольные напитки, молочные напитки на основе молочнокислых бактерий и напитки на основе молочнокислых бактерий. Кроме того, примерами таких пищевых продуктов и напитков являются обычно используемые формы пищевых продуктов и напитков, например продукты в твердой форме, такие как порошки и гранулы; пасты; жидкости и т.п. Кроме того, осушенные микробные клетки могут быть подвергнуты обработке с получением таблеток, порошков, жевательных таблеток, жестких капсул, мягких капсул, драже и т.п.

Примеры

Настоящее изобретение более подробно описано в нижеследующих примерах, однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами. Кроме того, в нижеследующих примерах число жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei* было определено методом, описанным ниже.

Подсчет жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei*.

Осушенные клетки *Lactobacillus casei* серийно разводили физиологическим раствором (0,85% NaCl). Разведенный раствор (1 мл) перемешивали и разводили агаровой средой для подсчета клеток в планшете с добавлением ВСР, а затем клетки культивировали при 37°C в течение 72 ч. Затем образовавшиеся колонии подсчитывали и полученное число умножали на коэффициент разведения, полученный результат использовали как число жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei*.

Пример 1.

Получение осушенных клеток *Lactobacillus casei* (1).

Бактерии *Lactobacillus casei* YIT 9029 культивировали в анаэробных условиях при 37°C в течение 20 ч в среде (pH 7), содержащей дрожжевой экстракт (1%), монофосфат калия (0,1%), дифосфат калия (0,2%) и лактозу (2%). После завершения культивирования культуральный раствор охлаждали до температуры 20°C или ниже и pH раствора доводили до 7,0 путем добавления 5н. раствора гидроксида натрия. Клетки, полученные путем центрифугирования этого культурального раствора (14000 г, 4°C, 30 мин), собирали. Дисперсионную среду приготавливали в общем объеме 1000 мл, и состав этой среды указан в табл. 1, представленной ниже. Затем клетки суспендировали в дисперсионной среде при $2,0 \times 10^{11}$ к.о.е./мл. Клеточную суспензию распределяли по поддонам, и осушенные клетки получали методом лиофилизации. Кроме того, лиофилизацию осуществляли на лиофилизаторе TAKARA FREEZE-DRYER TF20-80 TANNS (TAKARA ATM Ltd.) в условиях хранения при температуре -40°C в течение 9 ч, а затем при температуре 20°C в течение 80 ч. Полученные осушенные клетки измельчали на мельнице, а затем измельченные клетки загружали в капсулы (состоящие из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу в обычных атмосферных условиях без дегазирования и капсулы помещали в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (изготовленным компанией Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) и хранили при 35°C в течение 4 недель, а затем подсчитывали число жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei*. Отношение числа жизнеспособных клеток после хранения к числу жизнеспособных клеток в начале хранения (степень выживаемости) указано в табл. 1.

Таблица 1

Компоненты дисперсионной среды (%)		Способ 1 согласно изобретению	Сравнительный способ 1	Сравнительный способ 2
Протективный агент	Глутамат Na	10	10	10
	Трегалоза	10	10	10
	Декстрин	-	-	5
Антиоксидант	Аскорбат Na	1	-	-
	Витамин Е	-	-	-
	Катехин	-	-	-
Хелатообразующий агент	Цитрат Na	1	-	-
	Очищенная вода	Остальное	Остальное	Остальное
Степень выживаемости (%) после хранение при 35°C в течение 4 недель		33	22	22

Способ 1 согласно изобретению, в котором использовалась дисперсионная среда, содержащая протективный агент (глутамат натрия и трегалозу), антиоксидант (аскорбат натрия) и хелатообразующий агент (цитрат натрия), давал более высокую степень выживаемости, чем сравнительный способ 1 и сравнительный способ 2, в котором использовалась дисперсионная среда, не содержащая антиоксиданта или хелатообразующего агента.

Пример 2.

Получение осушенных клеток *Lactobacillus casei* (2).

Лиофилизированные клетки *Lactobacillus casei* YIT 9029 получали, как описано в примере 1, за исключением того, что состав дисперсионной среды был изменен, как указано в табл. 2, и клетки помещали в капсулы (состоящие из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу в обычных атмосферных условиях без дегазирования, эти капсулы помещали в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (изготовленным компанией Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) и хранили при 35°C в течение 4 недель, а затем подсчитывали число жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei*. Отношение числа жизнеспособных клеток после хранения к числу жизнеспособных клеток в начале хранения (степень выживаемости) указано в табл. 2.

Таблица 2

Компоненты дисперсионной среды (%)		Способ 1 согласно изобретению	Сравнительный способ 3	Сравнительный способ 4	Сравнительный способ 5
Протективный агент	Глутамат Na	10	10	10	10
	Трегалоза	10	10	10	10
	Декстрин	-	-	-	-
Антиоксидант	Аскорбат Na	1	-	-	-
	Витамин Е	-	-	0,85	-
	Катехин	-	-	-	0,05
Хелатообразующий агент	Цитрат Na	1	-	-	-
	Очищенная вода	Остальное	Остальное	Остальное	Остальное
Степень выживаемости (%) после хранение при 35°C в течение 4 недель		33	27	17	16

Степень выживаемости в сравнительных способах 3-5, в которых использовалась дисперсионная среда, не содержащая хелатообразующего агента, была ниже, чем в способе 1 согласно изобретению. Исходя из результатов примеров 1 и 2 было обнаружено, что степень выживаемости осушенных клеток, хранящихся в течение длительного периода времени при высокой температуре и полученных с использованием дисперсионной среды, содержащей ниже следующие три компонента: протективный агент, антиоксидант и хелатообразующий агент, была выше, чем в случае использования только протективного агента или только протективного агента и антиоксиданта.

Пример 3.

Получение осушенных клеток *Lactobacillus casei* (3).

Лиофилизированные клетки *Lactobacillus casei* YIT 9029 получали способом 1 согласно изобретению, описанным в примере 1, и помещали в капсулы (состоящие из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу в обычных атмосферных условиях без дегазирования, а затем эти капсулы упаковывали в РТР (путем прессования в упаковке, изготовленной из алюминиевого листа и винилхлорида), после чего капсулы помещали в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (изготовленным компанией Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) и хранили в условиях, указанных в табл. 3, а затем подсчитывали число жизнеспособных клеток *Lactobacillus casei*. Отношение числа жизнеспособных клеток после хранения к числу жизнеспособных клеток в начале хранения (степень выживаемости) указано в табл. 3. Кроме того, хранение осуществляли в следующих условиях: 2°C, 1 день → 35°C, 2 дня → 30°C, 6 дней → 22°C, 6 месяцев, и эти условия были выбраны с учетом того, что лиофилизированные клетки транспортировали при 30-35°C, а затем хранили при 22°C. Кроме того, лиофилизированные клетки после хранения обладали низкой гигроскопичностью, не образовывали агрегатов и сохраняли свой внешний вид, цвет, запах и т.п., как и в начале хранения, а поэтому эти клетки являются предпочтительными.

Таблица 3

	2°C, 1 день → 35°C, 2 дня → 30°C, 6 дней → 22°C, 6 месяцев	22°C, 6 месяцев
Степень выживаемости (%)	39	41

Было показано, что жизнеспособность клеток была подходящей в следующих условиях хранения: 2°C, 1 день → 35°C, 2 дня → 0°C, 6 дней → 22°C, 6 месяцев и в условиях хранения при 22°C в течение 6 месяцев, в частности, было показано, что жизнеспособность клеток была подходящей даже в условиях хранения: 2°C, 1 день → 35°C, 2 дня → 30°C, 6 дней → 22°C, 6 месяцев, которые были выбраны с учетом их практического применения.

Промышленное применение

Осушенные микробные клетки, полученные способом согласно изобретению, имеют высокую степень жизнеспособности даже при хранении этих клеток при высокой температуре в течение длительного периода времени. Следовательно, осушенные микробные клетки являются превосходными с точки зрения их распределения и хранения. Кроме того, осушенные микробные клетки, полученные способом согласно изобретению, могут быть использованы для приготовления пищевых продуктов, напитков и т.п.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дисперсионная среда для сушки микробных клеток, представляющая собой водный раствор, содержащий глутамат натрия и трегалозу в качестве протективных агентов, аскорбат натрия в качестве антиоксиданта и цитрат натрия в качестве хелатообразующего агента.

2. Дисперсионная среда по п.1, где содержание протективного агента, антиоксиданта и хелатообразующего агента составляет от 5 до 30 мас.%, от 0,05 до 5 мас.% и от 0,5 до 5 мас.% соответственно.

3. Способ получения осушенных микробных клеток, отличающийся тем, что микробные клетки суспендируют в водной дисперсионной среде по п.1 или 2 с последующей сушкой полученной суспензии.

4. Способ по п.3, где микробными клетками являются клетки микроорганизма, принадлежащего к роду *Lactobacillus*.

5. Способ по п.1 или 4, в котором сушку осуществляют методом лиофилизации.

