(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 046292 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.22

(21) Номер заявки
202092379

(22) Дата подачи заявки
2019.02.14

(51) Int. Cl. ***C12N 1/04*** (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ВЫСУШЕННЫХ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

(31) **2018-072833**
(32) **2018.04.05**
(33) **JP**
(43) **2020.12.23**
(86) **PCT/JP2019/005204**
(87) **WO 2019/193841 2019.10.10**

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

(72) Изобретатель:
Миида Сатоси, Макино Юдзуру, Мацуи Акихиса, Ито Масахико, Мотеки Ясухиро (JP)

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

(56) WO-A1-2017073752
JP-A-2012055288
JP-A-2016105705

(57) Изобретение относится к новому способу снижения повреждения и гибели микробных клеток посредством способа получения высокожизнеспособных высушенных микробных клеток, где способ отличается тем, что высушенные микробные клетки подвергают обработке переменными температурами.

046292 B1

046292 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения высокожизнеспособных высушенных микробных клеток, обладающих высокой жизнеспособностью после хранения.

Уровень техники

Существует множество микроорганизмов, имеющих полезную ферментативную активность, и такие микроорганизмы широко используются для получения функциональных пищевых материалов, таких как углеводы, аминокислоты и фосфолипиды.

В частности, среди таких микроорганизмов молочнокислые бактерии традиционно широко используются для получения молочных продуктов, таких как йогурт и сыр, и в последние годы имели место достижения в разработке продуктов питания, напитков и т.п. с использованием высушенных молочнокислых бактерий. В этом случае для получения эффекта молочнокислых бактерий желательно использовать живые клетки, но в процессе получения высушенных клеток часто клетки подвергаются повреждению и погибают, и трудно получить необходимое количество живых клеток.

В качестве способа снижения повреждения и гибели клеток, например, известен способ коррекции дисперсионной среды, которую используют при высушивании клеток (PTL 1, PTL 2 и NPL 1).

Однако в качестве способа снижения повреждения и гибели клеток известен только способ, который проводят до высушивания клеток.

Список цитируемых ссылок

Патентные документы.

PTL 1: патент Японии № 3504365.

PTL 2: публикация нерассмотренной заявки на патент Японии JP-A-2010-4787.

Непатентные документы.

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

Сущность изобретения

Техническая задача

Следовательно, целью настоящего изобретения является разработка нового способа снижения повреждения и гибели клеток.

Решение задачи

Авторы настоящего изобретения провели обширные исследования для достижения вышеуказанной цели, и в результате, несмотря на то, что тепловой стресс обычно вызывает снижение жизнеспособности микроорганизмов, они неожиданно обнаружили, что жизнеспособность после хранения повышается, если высушенные клетки подвергнуть обработке переменными температурами, соответствующей тепловому стрессу, после получения высушенных клеток, и тем самым завершили настоящее изобретение.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения высокожизнеспособных высушенных микробных клеток, отличающемуся тем, что высушенные микробные клетки подвергают обработке переменными температурами.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу повышения жизнеспособности высушенных микробных клеток, отличающемуся тем, что высушенные микробные клетки подвергают обработке переменными температурами.

Преимущественные эффекты изобретения

В соответствии с настоящим изобретением жизнеспособность после хранения полученных ранее высушенных микробных клеток можно повысить с использованием простого способа обработки переменными температурами.

Описание вариантов осуществления

Способ получения высокожизнеспособных высушенных микробных клеток по настоящему изобретению (далее именуемый "способ получения по настоящему изобретению") сконфигурирован так, что высушенные микробные клетки подвергаются обработке переменными температурами.

Высушенные микробные клетки, которые используются в способе получения по настоящему изобретению, особым образом не ограничиваются, однако их примеры включают клетки, полученные высушиванием микроорганизмов, таких как молочнокислые бактерии. Примеры молочнокислых бактерий включают молочнокислые бактерии рода Lactobacillus, такие как Lactobacillus casei, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus cremoris, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus yoghurti, Lactobacillus delbruecki подвид bulgarius, Lactobacillus delbrueckii подвид delbrueckii, Lactobacillus johnsonii и Lactobacillus mali, бактерии рода Bifidobacterium, такие как Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve и Bifidobacterium longum, бактерии рода Streptococcus, такие как Streptococcus thermophilus и Streptococcus lactis, бактерии Lactococcus, такие как Lactococcus lactis подвид lactis, Lactococcus lactis подвид cremoris, Lactococcus plantarum и Lactococcus raffinolactis, а также бактерии рода Enterococcus, такие как Enterococcus faecalis и Enterococcus faecium. Можно комбинировать один вид или два или более вида молочнокислых бактерий. Среди микроорганизмов предпочтительными являются молочнокислые бактерии. Среди молочнокислых бактерий предпочтительными являются молочнокислые бактерии рода Lactobacillus, и вид Lactobacillus casei

является более предпочтительным, и Lactobacillus casei YIT 9029 (FERM BP-1366, дата депонирования: 1 мая 1981 г., Международный депозитарий запатентованных организмов, Национальный институт технологий и оценки (№ 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kizarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Япония) особенно предпочтителен.

Способ получения высушенных клеток посредством высушивания микроорганизмов особым образом не ограничен, и можно использовать распылительную сушку, лиофилизацию или т.п., хорошо известные специалистам в данной области. Конкретные примеры способа включают способы, описанные в патенте Японии № 3504365, публикации нерассмотренной заявки на патент Японии JP-A-2010-4787, публикации G.L. DE ANTONI et al., "Trehalose, a Cryoprotectant for Lactobacillus bulgaricus", Cryobiology, 26, p. 149-153, 1989, WO 2017/073752 и т.п. Среди этих способов предпочтительным является способ, описанный в международной заявке WO 2017/073752.

Более конкретно, способ, описанный в WO 2017/073752, осуществляют следующим образом.

Сначала микроорганизмы культивируют обычным способом и затем собирают клетки обычным способом. Следует отметить, что при необходимости можно выполнить промывание между, до или после культивирования микроорганизмов и сбора клеток.

Собранные таким образом микробные клетки вносят в дисперсионную среду, представляющую водный раствор, содержащий протектор, антиоксидант и хелатирующий агент, предпочтительно водный раствор, состоящий из протектора, антиоксиданта и хелатирующего агента (в дальнейшем также просто называемый "дисперсионной средой") и суспендируют в ней, полученную суспензию высушивают с получением тем самым высушенных микробных клеток.

Вода, используемая в дисперсионной среде, особым образом не ограничена, однако можно использовать, например, питьевую воду, такую как очищенная вода или деионизированная вода.

Протектор, который используют в дисперсионной среде, особым образом не ограничен, однако в качестве примера можно привести глутаминовую кислоту или ее соль, такую как глутамат натрия или глутамат калия, дисахарид, такой как трегалоза, сахароза, лактоза или мальтоза, глицерин, мальтодекстрин, циклодекстрин, сухое обезжиренное молоко и т.п. Среди протекторов предпочтительно использовать глутаминовую кислоту или ее соль и/или дисахарид и более предпочтительны глутамат натрия и/или трегалоза. Содержание протектора в дисперсионной среде особым образом не ограничивается, но предпочтительно составляет, например, от 1 до 40 мас.%, более предпочтительно от 5 до 30 мас.%.

Кроме того, антиоксидант, который используют в дисперсионной среде, особым образом не ограничен, однако, например, можно использовать аскорбиновую кислоту или ее соль, такую как аскорбат натрия или аскорбат кальция, витамин Е, катехин, глутатион, астаксантин и т.п., и среди антиоксидантов предпочтительным является аскорбат натрия. Содержание антиоксиданта в дисперсионной среде особым образом не ограничено, но составляет, например, предпочтительно от 0,01 до 10 мас.%, более предпочтительно от 0,05 до 5 мас.%.

Кроме того, хелатирующий агент, который используют в дисперсионной среде, особым образом не ограничен, однако можно использовать, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), лимонную кислоту или ее соль, такую как цитрат натрия, фитиновую кислоту или тому подобное. Содержание хелатирующего агента в дисперсионной среде особым образом не ограничено, но составляет, например, предпочтительно от 0,1 до 10 мас.%, более предпочтительно от 0,5 до 5 мас.%.

В качестве предпочтительного типа дисперсионной среды можно привести в качестве примера водный раствор, содержащий глутамат натрия, трегалозу, аскорбат натрия и цитрат натрия.

Количество микробных клеток, которые суспендируют в дисперсионной среде, особым образом не ограничено, однако, например, количество микробных клеток в суспензии составляет примерно от $1{,}0\times10^{5}$ до $4{,}0\times10^{14}$ КОЕ/мл, более предпочтительно примерно от $1{,}0\times10^{7}$ до $4{,}0\times10^{13}$ КОЕ/мл.

Способ высушивания суспензии особым образом не ограничен, и например, можно использовать известный способ высушивания, такой как лиофилизация или распылительная сушка, однако для повышения уровня жизнеспособности микроорганизмов на стадии сушки предпочтительной является лиофилизация. Примеры условий сушки в способе лиофилизации включают условия, в которых проводят обработку замораживанием при температуре от -35 до -45°С в течение 6-12 ч и затем обработку высушиванием при температуре от 12 до 32°С в течение 40-90 ч.

Высушенные микробные клетки, полученные, как описано выше, затем подвергают обработке переменными температурами. Следует отметить, что высушенные микробные клетки перед обработкой переменными температурами, например, измельчают с использованием измельчителя, и измельченные клетки помещают в капсулы из гидроксипропилметилцеллюлозы в количестве 0,2 г на капсулу с обычным воздушным составом без дегазации, затем капсулы помещают в пакет или подобный контейнер, сделанный из алюминия или подобного материала, вместе с поглотителем кислорода, и в таком состоянии высушенные микробные клетки можно подвергнуть обработке переменными температурами.

Обработка переменными температурами представляет собой обработку, при которой температурная нагрузка отличается от комнатной температуры, при которой обычно хранятся высушенные микробные клетки, и применяется в течение определенного периода или дольше. В частности, выполняют одну, две

или более обработок, выбранных из группы, состоящей из следующих обработок (a) и (b):

(a) обработка нагреванием до 30°C или выше в течение 1 суток или более;

(b) охлаждение до 10°C или ниже в течение 1 суток или более.

Обработки (a) и (b) можно проводить по отдельности или в комбинации или можно проводить повторно.

Предпочтительные примеры обработки (a) включают следующие виды обработки:

(a1) обработка нагреванием до 30°C или выше, предпочтительно от 35 до 37°C в течение 1 суток или более, предпочтительно 2 суток; и

(a2) обработка нагреванием до 30°C или выше, предпочтительно от 35 до 37°C в течение 1 суток или более, предпочтительно 1 суток.

Предпочтительные примеры обработки (b) включают следующую обработку:

(b1) охлаждение до 10°C или ниже, предпочтительно от 2 до 10°C в течение 1 суток или более, предпочтительно 1 суток.

В предпочтительной обработке переменными температурами, например, осуществляют обработку (a), или после проведения обработки (b) затем осуществляют обработку (a), и в более предпочтительной обработке переменными температурами осуществляют обработку (a1), или после проведения обработки (b1) затем осуществляют обработку (a1), или затем осуществляют обработку (a2), и в особенно предпочтительной обработке переменными температурами осуществляют обработку (a1).

Такую обработку переменными температурами в случае нагревания можно осуществлять с использованием устройства, обеспечивающего нагревание, такого как сушилка или автоклав, и в случае охлаждения обработку можно осуществлять с использованием устройства, обеспечивающего охлаждение, такого как холодильник или морозильная камера. Следует отметить, что при осуществлении такой обработки переменными температурами давление и т.п. особым образом не ограничивается.

Полученные таким образом высушенные микробные клетки имеют жизнеспособность на уровне 110% или выше по сравнению с вариантом, когда высушенные микробные клетки не подвергаются обработке переменными температурами, при хранении в течение 6 месяцев, и имеют жизнеспособность на уровне 120% или выше, предпочтительно жизнеспособность на уровне от 130 до 140% по сравнению с вариантом, когда высушенные микробные клетки не подвергаются обработке переменными температурами, при хранении в течение 12 месяцев.

Высокожизнеспособные высушенные микробные клетки можно использовать для тех же целей, что и обычные высушенные микробные клетки. В частности, высокожизнеспособные высушенные микробные клетки можно использовать в продуктах питания и напитках непосредственно или смешиванием с другим питательным веществом, которое обычно добавляют в продукты питания. Примеры продуктов питания включают переработанные мясные продукты, такие как ветчина и колбасные изделия, переработанные рыбные продукты, такие как камабоко (изготавливается из сурими, мелко изрубленного филе рыбы с белым мясом) и чикува (продукт из рыбной пасты наподобие длинных сосисок), хлеб, кондитерские изделия, масло и ферментированное молоко, такое как йогурт. Кроме того, примеры напитков включают безалкогольные напитки, молочные напитки с молочнокислыми бактериями и напитки с молочнокислыми бактериями. Кроме того, примеры форм пищевых продуктов и напитков включают обычно используемые формы пищевых продуктов и напитков, например твердые вещества, такие как порошок и гранулы, пасту, жидкость и т.п. Кроме того, высушенные микробные клетки можно составлять в виде, например, таблетки, порошка, жевательной таблетки, твердой капсулы, мягкой капсулы, пилюли и т.п.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано подробно с помощью примеров, однако настоящее изобретение никоим образом не ограничивается этими примерами. Следует отметить, что в следующих примерах количество жизнеспособных клеток Lactobacillus casei измеряли следующим методом.

Метод измерения количества жизнеспособных клеток Lactobacillus casei.

Готовили серийные разведения высушенных клеток Lactobacillus casei на физиологическом растворе (0,85 мас.% хлорида натрия). Разбавленный раствор (1 мл) смешивали и титровали на чашках с агаром BCP для подсчета количества клеток и клетки культивировали при 37°C в течение 72 ч. Затем образовавшиеся колонии подсчитывали, полученное количество умножали на коэффициент разведения и полученное значение использовали в качестве показателя количества жизнеспособных клеток Lactobacillus casei.

Пример 1.

Приготовление высушенных клеток Lactobacillus casei и обработка переменными температурами.

Lactobacillus casei YIT 9029 культивировали в анаэробных условиях при 37°C в течение 20 ч в среде (pH 7), содержащей дрожжевой экстракт (1 мас.%), монофосфат калия (0,1 мас.%), дикалийфосфат (0,2 мас.%) и лактозу (2 мас.%). После окончания культивирования культуральный раствор охлаждали до температуры жидкости 20°C или ниже и pH раствора доводили до 7,0 с помощью 5н. раствора гидроксида натрия. Клетки, полученные центрифугированием культурального раствора (14000×g, 4°C, 30 мин),

собирали и клетки суспендировали с титром $2,0\times10^{11}$ КОЕ/мл в дисперсионной среде, приготовленной с доведением общего объема до 1000 мл в соответствии с составом, содержащим глутамат натрия (10 мас.%), трегалозу (10 мас.%), аскорбат натрия (1 мас.%) и цитрат натрия (1 мас.%). Суспензию клеток помещали в лоток и высушенные клетки получали методом лиофилизации. Следует отметить, что лиофилизацию проводили с использованием лиофилизатора (TAKARA FREEZE-DRYER TF20-80 TANNS, производства TAKARA ATM Co., Ltd.) при температуре полки -40°C в течение 9 ч и затем в условиях температуры полки 20°C в течение 80 ч. Полученные высушенные клетки измельчали с помощью измельчителя и измельченные клетки помещали в капсулы (сделанные из гидроксипропилметилцеллюлозы) в количестве 0,2 г на капсулу с обычным воздушным составом без дегазации, затем капсулы помещали в алюминиевый пакет вместе с поглотителем кислорода (производства Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.).

Полученный выше алюминиевый пакет сразу после приготовления нагревали при 35°C в течение 2 суток и затем хранили при 22°C в течение 6 месяцев (способ осуществления 1). Кроме того, полученный выше алюминиевый пакет сразу после приготовления охлаждали при 2°C в течение 1 суток, затем нагревали при 35°C в течение 2 суток и затем хранили при 22°C в течение 6 месяцев (способ осуществления 2). Кроме того, полученный выше алюминиевый пакет сразу после приготовления нагревали при 37°C в течение 1 суток и после этого хранили при 22°C в течение 6 месяцев (способ осуществления 3). Следует отметить, что полученный выше алюминиевый пакет хранили при 22°C в течение 6 месяцев, и полученный результат использовали для сравнения. Результаты измерения количества жизнеспособных клеток до и после хранения приведены в табл. 1. Также рассчитывали уровень жизнеспособности на основе подсчета жизнеспособных клеток с использованием приведенной ниже формулы и также рассчитывали уровень повышения жизнеспособности соответствующих способов осуществления по сравнению со сравнительным способом (без обработки переменными температурами) по приведенной ниже формуле. Результаты также приведены в табл. 1.

Таблица 1

	До хранения	После хранения в течение 6 месяцев	Уровень жизнеспособности	Уровень повышения жизнеспособности
Сравнительный способ	2730×10^8 клеток/г	618×10^8 клеток/г	22,6%	-
Способ осуществления 1	2730×10^8 клеток/г	745×10^8 клеток/г	27,3%	121%
Способ осуществления 2	2730×10^8 клеток/г	700×10^8 клеток/г	25,6%	113%
Способ осуществления 3	2730×10^8 клеток/г	720×10^8 клеток/г	26,4%	117%

Формула 1:

Уровень жизнеспособности (%) = (количество жизнеспособных клеток после хранения/количество жизнеспособных клеток до хранения) × 100.

Формула 2:

Уровень повышения жизнеспособности (%) = (уровень жизнеспособности в способе осуществления/уровень жизнеспособности в сравнительном способе) × 100.

Согласно полученным результатам было установлено, что уровень жизнеспособности после 6-месячного хранения в каждом из способов осуществления составляет 25% или выше, и, следовательно, каждый из способов осуществления обеспечивает жизнеспособность не менее 110% или выше по сравнению с вариантом, когда обработку переменными температурами не проводили (сравнительный способ).

Пример 2.

Долгосрочное хранение высушенных клеток Lactobacillus casei.

Высушенные клетки после 6-месячного хранения, полученные в примере 1, затем хранили при 25°C в течение 6 месяцев, и результаты измерения количества жизнеспособных клеток до и после хранения, измеренные аналогично тому, как описано в примере 1, приведены в табл. 2. Также рассчитывали уровень жизнеспособности и уровень повышения жизнеспособности аналогично тому, как описано в примере 1. Результаты также приведены в табл. 2.

Таблица 2

	До хранения	После хранения в течение 12 месяцев	Уровень жизнеспособности	Уровень повышения жизнеспособности
Сравнительный способ	2730×10^8 клеток/г	440×10^8 клеток/г	16,1%	-
Способ осуществления 1	2730×10^8 клеток/г	590×10^8 клеток/г	21,6%	134%
Способ осуществления 2	2730×10^8 клеток/г	575×10^8 клеток/г	21,1%	131%
Способ осуществления 3	2730×10^8 клеток/г	580×10^8 клеток/г	21,2%	132%

Согласно полученным результатам было установлено, что уровень жизнеспособности после 12-месячного хранения в каждом из способов осуществления составляет 21% или выше, и, следовательно, каждый из способов осуществления обеспечивает жизнеспособность не менее 130% или выше по сравнению с вариантом, когда обработку переменными температурами не проводили (сравнительный способ).

Промышленная применимость

Настоящее изобретение можно использовать для получения высушенных микробных клеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения жизнеспособности высушенных микробных клеток, в котором высушенные микробные клетки представляют собой высушенные клетки молочнокислых бактерий рода Lactobacillus, отличающийся тем, что высушенные микробные клетки подвергают обработке с переменной температурой, причем проводят одну обработку (a) или комбинацию (a) + (b); причем обработка (a) представляет собой нагревание при 30-37°C в течение от 1 до 2 дней и обработка (b) представляет собой охлаждение при 2-10°C в течение от 1 до 2 дней.

2. Способ повышения жизнеспособности высушенных микробных клеток по п.1, в котором обработку (a) проводят после обработки (b).

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2