



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326053**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A23K 1/14 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A21D 2/38 (2006.01)

A23L 1/10 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

A23L 1/16 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/164 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A23L 1/185 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19992411	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.11.14 PCT/SE97/01918
(22)	Inng.dag	1999.05.20	(85)	Videreføringsdag	1999.05.20
(24)	Løpedag	1997.11.14	(30)	Prioritet	1996.11.20, SE, 9604251
(41)	Alm.tilgj	1999.05.20			
(45)	Meddelt	2008.09.08			
(73)	Innehaver	Rural Patent Svenska AB, Box 30192, SE-104 25 Stockholm, SE Ivar Lönnroth, Slätthultsliden 8, 43169 MÖLNDAL, SE Stefan Lange, Nedre Fogelbergsgatan 9B, 41128 GÖTEBORG, SE Leif Göransson, Kågeröd, SE			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av produkter med enzymatisk aktivitet for fremstilling av næringsmiddel som,når det konsumeres, induserer antisekretoriske proteiner.			
(56)	Anførte publikasjoner	Göransson et al., 1993, "Feed-induced Lectins in piglets", J.Vet.Med, vol 40, s. 478-484. US 5565225, WO 9109536			
(57)	Sammendrag				

Anvendelse av produkter med enzymatisk aktivitet for fremstilling av et næringsmiddel, deriblant för, som induserer antisekretoriske proteiner når det konsumeres og næringsmidlene som er fremstilt på denne måte. Produktene med enzymatisk aktivitet kan for eksempel være maltet korn.

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelsen av produkter med enzymatisk aktivitet for fremstilling av et næringsmiddel som induserer dannelsen av antisekretoriske proteiner (ASP).

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Kraftig sekresjon av kroppsvæsker oppstår i flere ulike situasjoner. Et stort inntak av næringsstoffer før en fysisk aktivitet fører lett til sekresjon av kroppsvæske inn til tarmene. Den fysiske aktivitet i seg selv fører til en strøm av væske i muskler og ledd. Dette fenomen gir opphav til stivhet og redusert utfoldelse. Irritasjon av tarmveggen med ulike stoffer gir lett en ubehagelig myk konsistens på avføringen.

10

I Sverige er det mer en 10000 ostomiopererte personer. Ca. 1000 nye kommer hvert år. En ikke så ubetydelig del av disse personer opereres for tynntarmostomi (ileostomi). I tilfeller hvor sekresjonen overskrider én liter per dag, oppstår ofte problemer på grunn av en kraftig strøm i ostomiposen som krever hyppige skiftinger og tømning av posen. For hvert individ bringer dette et betydelig ubehag med restriksjoner i sosiale aktiviteter, arbeidskapasitet, væskemangel og kalori- og mineralmangel. Personer med disse problemer har hatt problemer med å få effektiv hjelp.

20

I løpet av de senere år har viktige funn med hensyn til kroppens evne til å regulere netto strøm av væske og elektrolytter i tarmen blitt gjort. Ulike peptider med kapasitet til å forsterke resorpsjon av væske og elektrolytter over tarmveggen har blitt funnet. De viktigste av disse hormonlignende peptider er somatostatin og neuropeptid γ (Krieger DT og Martin JB, *N. Engl. J. Med.* 304:876-885, 1981; Miller J., *Regulatory peptides* 4 (Suppl.):203:208, 1985) såvel som de såkalte antisekretoriske proteiner (Lange S. og Lönnroth I., *FEMS Microbiol. Letters* 24: 165-168, 1984; Lange og Lönnroth I., *Biochim. Biophys. Acta* 883:138-144, 1986). ASP reverserer sekresjonen og øker resorpsjonen av væske og elektrolytter i tarmen.

25

30 Teknikkens stand

Det er kjent fra SE 9000028-2 (publikasjonsnr. 466331) at dannelsen av en antisekretorisk faktor (ASF) eller antisekretorisk protein kan stimuleres hos dyr ved å føre dyrene med fôr hvorved aminosyrer og/eller sukkerrør og/eller amider i visse mengder er tilsatt. Som følge av dannelsen av denne antisekretoriske faktor kan man redusere diaré av ulike årsaker hos dyr. Ved å beregne innholdet av ASP ved hjelp av en fremgangsmåte beskrevet i nevnte patent kan mengdene aminosyrer og sukker justeres slik at en effektiv mengde av ASP dannes til en kostnad som er kommersielt interessant.

35

Det er kjent fra f.eks. Khin-Maung-U og William Greenough III (*J. Pediatrics* 118, 72-85 (1991)) at risemel og hvetemel i tillegg til uttrekk derav kan anvendes for rehydratisering av diaré. Salter er ofte tilsatt for å kompensere for tapet av disse forbindelser. Formålet med disse preparater er kun å kompensere for væsketapet som allerede har funnet sted.

Kort beskrivelse av oppfinnelsen

Målsetningen med oppfinnelsen er å tilveiebringe et næringsmiddel som lindrer eller avhjelper problemene og fenomenet forbundet med den uønskede sekresjon av kroppsvæsker beskrevet ovenfor. Målsetningen med oppfinnelsen oppnås ved anvendelse av produktene med enzymatisk aktivitet for å tilveiebringe et næringsmiddel som, når det konsumeres, induserer dannelsen av antisekretoriske proteiner.

15 Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av produkter med enzymatisk aktivitet for fremstilling av næringsmiddel som, når det konsumeres, induserer antisekretoriske proteiner (ASP) som regulerer strømmen av væske og elektrolytter i tarmen slik at 1 ml blod vil inneholde minst 0,5 enheter ASP.

20 Under det fortsatte arbeid med studier av dannelsen av ASP er det overraskende funnet at dannelsen av ASP ikke bare stimuleres av tilføringen av aminosyrer og sukkerer, men også av næringsmidler hvorved enzymer har blitt tilsatt som kan hydrolysere næringsmiddeleinnholdet av karbohydrater og proteiner i en slik grad at mengdene av sukkerer og aminosyrer kjent *per se* forekommer i tarmkanalen.

25 Det har så overraskende blitt funnet at dannelsen av ASP kan kontrolleres eller styres ved hjelp av variasjon av mengden og andelen av produktet med enzymatisk aktivitet. På grunn av dette kan næringsmidler fremstilles med en sammensetning slik at innholdet av ASP dannet ved gjentatt konsumering kan bestemmes med en sannsynlig grad av sikkerhet. Dette er særlig signifikant ettersom doseresponsen varierer mellom

30 ulike kategorier av individer.

Oppdagelsen av at maltede kornsorter har evnen til å tilveiebringe effektive mengder av sukkerer og aminosyrer er særlig overraskende. Dette åpner for muligheten av å fremstille næringsmidler som er nærende, velsmakende og som har evnen til å stimulere dannelsen av ASP.

35 Med begrepet "næringsmiddel", som anvendt heri, er ment å omfatte næringsmiddel for human konsumering såvel som næringsmiddel for dyr. Næringsmidlet er fortrinnsvis et produkt i form av brød, kjeks, pasta, korn og flak, grøt og velling, men kan også være et næringsmiddepreparat inneholdende kjøtt og kjøttprodukter, fett og fettprodukter eller melk og melkeprodukter.

Ifølge en foretrukken utførelsesform anvendes maltede kornsorter ved fremstillingen av det ASP-induserende næringsmiddel.

Begrepet "kornsorter" som anvendt heri, er ment å omfatte vanlige kornsorter eller korn slik som hvete, bygg, rug, havre, mais, hirse, durra og sukkerdurra.

- 5 "Maltet korn" omfatter sunne og ferske korn som har blitt utsatt for malting. Malting betyr at kornkjernene er gjort bløte og deretter er tillatt å spire ved et nøye kontrollert vanninnhold og temperatur inntil det er utviklet kimsudd. De spirte kjerner tørkes og spiringen avsluttes. Tørkingen kan drives slik at enzymaktiviteten forandres til et høyere eller mindre nivå. Det således erholdte produkt er malt.
- 10 Næringsmiddelstoffene i kjernene har så, i begrenset utstrekning, blitt hydrolysert og enzymene i skuddet har blitt aktivert. Den delvise hydrolyse fremmer også angrepet av endogene enzymer til fordøyelsessystemet på de nærende deler. Det er åpenbart at en viss forkoking eller varmebehandling også kan øke hydrolysegraden.

- Ved fremstilling av næringsmiddelprodukter kan det maltede korn tilsettes i
15 blanding med umaltet korn i slike forhold at ASP induseres når det således fremstilte næringsmiddel konsumeres.

- Det har blitt vist i tester at kornprodukter som også naturlig utgjør en betydelig del av det daglige næringsmiddelinntak, kan tilsettes enzymer eller fortrinnsvis maltprodukter for å erholde et næringsmiddel som, når det konsumeres, tilveiebringer
20 den ønskede ASP-induksjon.

- Mengdene og andelene av det maltede og ikke-maltede, dersom det er noe, korn som er krevet for å tilveiebringe den ønskede virkning, kan lett angis av fagfolk på området ved hjelp av vanlige tester hvor responsen på induksjonen av næringsmidlet måles i forhold til fremgangsmåten angitt i SE 9000028-2. I korte trekk omfatter
25 fremgangsmåten måling av en standardisert sekresjonsrespons i tynntarmen til rotten.

Det er vist at ASP-nivået som er krevd for å erholde den ønskede virkning er minst 0,5 enheter pr. ml blod.

- Det er innlysende at næringsmidler fremstilt som beskrevet heri kan varieres på mange måter og kan gis i ulike utførelsesformer. På grunn av dette kan diettmonotomi
30 unngås. Behovet av stimulering av ulike individer for å nå en effektiv ASP-konsentrasjon kan imøtegås ved måling av responsen på næringsmiddelinntak som angitt. Ved hjelp av oppfinnelsen kan man også kompensere for varierende aktivitet av enzympreparater såvel som forskjeller i enzymaktivitet mellom maltede korn.

- Det er videre åpenbart at næringsmidlet kan formuleres på mange ulike måter
35 for også å imøtekomme behovene for god smak og variasjon. Næringsmidler fremstilt på grunnlag av maltet korn kan tilveiebringes i form av frokostlag, brød, rundstykker og pastaprodukter, ved anvendelse av kjent teknikk. Når produkter fremstilles som krever fukting i vann, f.eks. brødfremstilling, må oppskriftene forandres basert på bakerens egne erfaringer. Det er også åpenbart at produktene kan formuleres som

pulver, ment for omrøring i vann eller lemonade eller lignende væske og konsumeres i form av en drikke.

Som eksempler på kjøttprodukter hvorved det maltede korn kan innføres, kan man nevne kjøttpudding inneholdende gryn eller pøsepudding der grynene er tilsatt i form av maltet produkt. Det er avgjørende er selvfølgelig at næringsmidlet formuleres slik at den ønskede stimulering av dannelsen av ASP oppnås.

Verdien av å ha evnen til å fremstille næringsmidler som induserer ASP i et forutbestemt nivå er åpenbart ut fra det faktum at det er mange situasjoner der redusert sekresjon er ønskelig, slik som ekstrem kroppsutøvelse. Det er således godt kjent at idrettsfolk får problemer med myk avføring når de presser seg selv til det ekstreme, samtidig med inntak av store næringsmiddel- og væskevolumer for å gi kroppen energirike karbohydrater. Brannmenn og soldater har lignende problemer og de får ofte myk avføring på grunn av stressituasjonene de er utsatt for. Et spesielt problem oppstår ved flyving av raske fly; pilotene må, på grunn av høye G-krefter, ha på seg en bleie, noe som kan unngås dersom avføringen kan gjøres mer hard ved hjelp av en ny diett. Næringsmidler fremstilt i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse har en stor potensiell verdi i slike situasjoner.

Oppfinnelsen er videre illustrert ved hjelp av følgende ikke-begrensende spesifikke eksempler.

Eksempel 1

Forsøk med maltet korn på personer anvendt for eksperimentelle formål

Flere personer brukt i forsøk ble tillatt å utprøve ulike frokostmåltider bestående av ulike kornprodukter. Blodprøver ble tatt før og etter prøveperioden; fra disse blodprøver ble antisekretoriske proteiner (ASP) isolert ved hjelp av affinitetskromatografi ifølge fremgangsmåten beskrevet i SE 9000028-2. Innholdet av ASP i prøvene ble målt i en bioanalyse i rotte ifølge en tidligere angitt fremgangsmåte (Lange S., *FEMS Microbiol. Letters* 15:239-242, 1982). I korte trekk besto fremgangsmåten i å operere inn en pålimt sløyfe på midten av tynntarmen hos rotten, ASP-prøven ble injisert intravenøst kort forut for injeksjon av koleratoksin, 3 µg, i tarmsløyfen. Etter 5 timer ble dyret avlivet og veid i tillegg til at lengden av den fritt dissekerte tarmsløyfe ble målt; responsen (mg væske per cm tarm) til dyrene som mottok ASP-prøven ble sammenlignet med den til kontrolldyrene som kun mottok buffer.

Dietten som ble gitt var:

- 1) brød bakt med hvetemel i blanding med 30 % "Frisk-plus" for til grisunger (Göransson L. et al., *J. Vet. Med.*, B, 40: 478-484, 1993);
- 2) brød bakt med hvetemel i blanding med 30 % vanlig byggmel;
- 3) samme som 2), men med maltet byggmel;

4) flak omfattende maltet havre.

Resultatene av forsøkene er vist i tabellen nedenfor hvor initialene til personene som var utsatt for eksperimentet er angitt i tillegg til aktiviteten, i enheter av ASP pr. ml

- 5 (1 enhet = mengden ASP for å tilveiebringe 50 % inhibering av koleratoksinsresponsen). Nettomengde korn tilsatt (ikke hvetemel eller annet korn inntatt av personene utsatt for forsøket etter måltidet omfattende testkorn) er angitt i parentes.

10

Dag	Diett, dag	ASP-aktivitet i blod, enheter/ml		
		EE	SL	
-135	-	0,0	0,0	
-150	"Frisk+"brød, 8d	1,4 (15 g)	0,9 (26 g)	
-52	-	0,0	0,0	
-31	byggbrød "ctr" 10d	0,0 (29 g)	0,0 (50 g)	
0	-	0,0	0,1	
8	maltet byggbrød, 7d	1,0 (25 g)	0,5 (50 g)	
21	-	0,0	0,4	
28	maltede havreflak, 13 d	1,3(25+25 g)	0,6 (60 g)	
37	-	0,6	1,1	
62	-	0,4	0,0	
		EJ	IJ	IL
0	-	0,0	0,0	0,1
12	maltede havreflak, 10 d	1,0 (25+25 g)	0,7 (25+25 g)	1,0 (25+25 g)
19	-	0,5	-	0,8

Normalt ser det ikke ut til at ASP skjer i humant blod, etter inntak av brød bakt av "Frisk +"- griseungeføde, ASP ble indusert i blodet til EE og SL. Disse to personer spiste så brød bakt på henholdsvis vanlig byggmel og maltet byggmel. Det vanlige byggbrød induserte ikke ASP, imidlertid induserte det maltede byggbrød ASP. Tolv dager etter at EE og SL hadde sluttet å spise brødet var ASP-verdien redusert til 0,0 i EE og 0,4 i SL. Samme personer spiste maltede havreflak tilsatt surmelk. Også i dette tilfelle ble ASP indusert. I likhet med det foregående forsøk økte ASP-verdien hos EE til et høyt nivå under forsøksperioden og sank så raskt mens SL hadde den høyeste ASP-verdien én uke etter forsøksperioden. Forsøket med maltede havreflak ble gjentatt med tre ytterligere personer. Alle fikk høye ASP-verdier under forsøksperioden; en viss økning ble også registrert uken etter at de hadde sluttet å spise testflakene.

Eksempel 2

15 Forsøk med griseføde hvorved enzymer var tilsatt

Forsøk på griser som akkurat var anvendt på en lignende måte som den som tidligere var beskrevet av Göransson et al. (1993). Et vanlig griseungefôr uten tilsetning av antibiotika, meget lik "Lantmännens Växfor", og det samme fôr tilsatt enzymet (en blanding av α - og β -amylase) ble gitt til 2 x 5 unger, med påbegynnelse tre dager før avvenningsdagen. Blodprøver ble tatt på dagen for avvenning (dag 0) og også seks dager etter avvenning (dag 6). Resultatet viste at ingen påviselige mengder ASP ble funnet i blodet til kontrollgruppen, mens testgruppen hadde et nivå på 0,9 enheter/ml allerede ved dag 0, der nivået økte til 1,5 enheter/ml ($n = 10$ per gruppe).

25 **Eksempel 3**

Under forsøksarbeidet ble det vist at rotter har responser på antisekretorisk induserende midler som er lik den hos mennesker. Som følge av dette er det enklere for fagfolk på området å utføre kontrollerte forsøk på rotter enn på mennesker. Fremgangsmåten for måling av induksjonen av antisekretorisk virkning hos rotte er beskrevet i SE 9000028-2.

I en vanlig laboratorietest ble deler av rotteføden erstattet med testmateriale. Rottene ble føret før eksperimentet med kontroll og testdietter i syv dager. På den åttende dag ble hevelse indusert (sekresjon ut) i tarmen ved injeksjon av 3,5 mikrogram koleratoksin. Vekten av den hovne tarm ble bestemt og vekten i forhold til tarmvekt til kontrollgruppen var et mål for graden av antisekretorisk virkning eller inhibering av sekresjon.

I ett forsøk ble følgende tarmvekter og inhiberingsgrader registrert:

Diett	Antall dyr	Tarmvekt, mg/cm	% inhibering
Kontrollfôr	3	453 ± 3	-
80 % kontrollfôr og 20 % damp- behandlede havrekorn	3	443 ± 16	2 (ikke signifikant)
80 % kontrollfôr og 20 % maltet hvete	3	82 ± 5	82 (signifi- kant)

Fra resultatene ovenfor kommer det frem at en meget signifikant inhibering av sekresjonen ble oppnådd i gruppen av rotter som mottok 20 % av fôret i form av maltet hvete eller, uttrykt på en annen måte ble en signifikant grad av antisekretorisk virkning oppnådd.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av produkter med enzymatisk aktivitet for fremstilling av
5 næringsmiddel som, når det konsumeres, induserer antisekretoriske proteiner (ASP)
som regulerer strømmen av væske og elektrolytter i tarmen slik at 1 ml blod vil
inneholde minst 0,5 enheter ASP.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor produktene med enzymatisk aktivitet er maltet
10 korn.
3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor det maltede korn er bygg, hvete, rug eller
havre.
- 15 4. Anvendelse ifølge krav 2, hvor det maltede korn er ris, mais eller sukkerdurra.
5. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 2-4, hvor det maltede korn er i blanding
med umaltet korn.
- 20 6. Anvendelse ifølge krav 1, hvor det fremstilte næringsmiddel er frokostflak,
brød, rundstykker eller pastaprodukter.