

(19) C2 (11) 65532 (13) UA

(98) а/с 781, м.Київ, 01005

(85) 1998-06-29

(74) Ошарова Ірина Олександрівна, (UA)

(45) [2004-04-15]

(43) null

(24) 2004-04-15

(22) 1996-11-26

(12) null

(21) 98063333

(46) 2004-04-15

(86) 1996-11-26 PCT/FR96/01871

(30) 95/14019 1995-11-27 FR

(54) ДІЄТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО АБСОРБУЄТЬСЯ, ДЛЯ ПОЛІПШЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО БАЛАНСУ ФЛОРИ КИШКОВОГО ТРАКТУ
ДИЕТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО БАЛАНСА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНОГО ТРАКТА ABSORBABLE DIETARY COMPOSITION FOR IMPROVING BIOLOGICAL BALANCE OF INTESTINAL TRACT FLORA

(56) Tsutomu Kaneko, Hiroharu Mori, Megumi Iwata and Sachiki Meguro, "Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by Propionibacterium freudenreichii and Several Intestinal Bacteria", 1994, J.Dairy Sci. 77:393-404. 1 US A 48063689, 21.03.1989. 1

(71)

(72) FR Руссель Едмон FR Руссель Едмон FR Руссель Едмон FR Легран Шарль FR Легран Шарль FR Легран Шарль

(73) FR ЛАБОРАТОРИС СТАНДА С.А. FR ЛАБОРАТОРИС СТАНДА С.А. FR ЛАБОРАТОРИС СТАНДА С.А.

Дегидратированный препарат содержит пропионовые бактерии, в количестве не менее 10^9 клеток на грамм, преимущественно - от 10^{10} до 10^{12} клеток на грамм, пригодные для получения легкоусвояемой композиции, способствующей поддержанию биологического равновесия микрофлоры кишечного тракта человека и других млекопитающих путем стимулирования развития бифидобактерий в кишечнике.

Дегідратований препарат, який містить пропіонові бактерії, у кількості принаймні 10^9 клітин на грам, переважно - приблизно від 10^{10} до 10^{12} клітин на грам, придатні для одержання легкозасвоюваної композиції для поліпшення біологічної рівноваги флори кишкового тракту людини та інших ссавців шляхом стимулювання розвитку біфідобактерій у кишечнику.

An absorbable dietary composition for improving the biological balance of intestinal tract flora in humans and mammals is disclosed. Said composition consists of a dehydrated preparation containing, propionic bacteria and bifid bacteria in an amount of at least 10^9 cells/g, preferably 10^{10} - 10^{12} cells/g.

1. Дегідратований препарат, який **відрізняється** тим, що він містить пропіонові бактерії, у кількості принаймні 10^9 клітин на грам, переважно - приблизно від 10^{10} до 10^{12} клітин на грам, придатні для одержання легкозасвоюваної композиції для поліпшення біологічної рівноваги флори кишкового тракту людини та інших ссавців шляхом стимулювання розвитку біфідобактерій у кишечнику.
2. Препарат за п.1, який **відрізняється** тим, що композиція містить біфідобактерії.
3. Препарат за п.2, який **відрізняється** тим, що композиція містить від 80 до 99 % пропіонових бактерій та від 20 до 1 % біфідобактерій.
4. Препарат за будь-яким з пп.1-3, який **відрізняється** тим, що пропіонові бактерії належать до роду *Propionibacterium freudenreichii* або *Propionibacterium shermanii* або *Propionibacterium thoeii* або *Propionibacterium jensenii* або *Propionibacterium acidipropionici*.
5. Препарат за будь-яким з пп.2-4, який **відрізняється** тим, що біфідобактерії належать до роду *Bifidobacterium* і вибрані з ліній *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis* та *B. Pseudolongum*.
6. Препарат за будь-яким з пп.1-5, який **відрізняється** тим, що композиція представлена у формі індивідуальних фракцій приблизно від 100 мг до 1 г, переважно - від 200 до 500 мг, і містить дозу бактерій для щоденного прийому.
7. Препарат за п.6, який **відрізняється** тим, що композиція представлена у формі капсул.
8. Препарат за будь-яким з пп.6 та 7, який **відрізняється** тим, що кожна індивідуальна фракція містить принаймні 10^9 , переважно - приблизно від 10^{10} до 10^{12} бактерій.

Даний винахід стосується легко засвоюваної дієтичної композиції для поліпшення біологічної рівноваги кишкової флори людини та інших ссавців.

Відомо, що травний тракт людини, місткість якого становить приблизно від 1 до 1,5 кг їжі у процесі її перетравлення, заселений великою популяцією мікроорганізмів, яка в ободовій кишці за оцінками складає близько 10^{10} клітин на грам.

Ця популяція складається з різних груп бактерій, деякі з яких є нешкідливими або навіть корисними, тоді як інші, особливо бактерії кишкової групи та гнильні бактерії, призводять до продукування токсичних речовин та згубно впливають на здоров'я.

З початку двадцятого століття було проведено чимало значних досліджень, мета яких полягала у тому, щоб продемонструвати той факт, що присутність великої популяції молочно-кислих бактерій дуже різко обмежує розвиток гнильних бактерій і, отже, продукування токсичних речовин.

Тож цілком природно, що було висунуто ідею про введення великої популяції цих бактерій в організм або з певними продуктами харчування, або шляхом прямого зараження цими мікробами через рот; серед прийнятних видів молочно-кислої флори було рекомендовано для вживання такі: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* або навіть *Streptococcus faecium* (вони були згадані лише як приклад, але цей перелік не є вичерпним).

Однак введення цих бактерій не привело до очікуваних результатів, бо, з одного боку, популяція мікробів у травному тракті являє собою масу, рівновагу якої радикально і на довгий час змінити важко, а з другого боку – було з'ясовано, що вживання молочно-кислих бактерій не має великого впливу на гнильну флору, яка викликає відомі хвороби та порушення.

Пізніше – у сімдесятих роках – з'явилася ідея впровадження в дієту людини біфідобактерій, які не належать до роду молочно-кислих і які виявили себе корисними для здоров'я. Закваски такого типу можуть вживатися або з молочними пудингами, або з іншими молочними продуктами, частково ферментованими біфідофлорою, або шляхом безпосереднього приймання живих клітин у прийнятній формі.

Однак на практиці таке введення бактерій не давало бажаних результатів, і зокрема через те, що дуже важко успішно пересадити на тривалий період екзогенні біфідобактерії у кишечник людини, особливо якщо рівновага її кишкової флори не є ідеальною.

На основі цих виявлених загальних фактів з'явилася головна ідея винаходу – знайти засіб, який дозволяв би збільшувати популяцію біфідобактерій.

У процесі цієї роботи автори натрапили на працю професора Анрі Беррана з м. Лілль, якому вдалося виявити, що пропіонова кислота є специфічно селективним і елективним елементом біфідофлори.

Відомо, що ця органічна кислота є одним з продуктів, які виникають здебільшого в результаті ферментації виключно лактату бактеріями певного типу – пропіоновими бактеріями, які хоч і не належать до молочно-кислих бактерій, однак присутні у продуктах харчування людини протягом кількох століть; саме цим бактеріям має завдячувати своїми дірочками сир "Емментал": вони утворюються тому, що наприкінці процесу приготування цей сир містить пропіонових бактерій близько 10^9 клітин на грам.

Слід зазначити, що крім пропіонової кислоти ферментацію пропіонових бактерій викликають також оцтова кислота та вуглекислота.

Паралельно з цією роботою, завдяки публікації Tsutomu Kaneko, Hiroharu Mori, Mediti Iwata and Sachiki Meguro, "Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by Propionibacterium freudenreichii and Several Intestinal Bacteria", 1994, J.Dairy Sci.77:393-404, було з'ясовано, що, з одного боку, пропіонові бактерії, особливо бактерії типу *Propionibacterium freudenreichii*, здатні продукувати фактор росту біфідобактерій, а з другого боку – коротколанцюгові жирні кислоти, особливо пропіонова кислота, мають яскраво виявлену пригнічуючу дію щодо розвитку багатьох шкідливих кишкових бактерій, але стимулюють розвиток біфідобактерій.

У патенті JP-A-07 227207 вже було запропоновано додавати пропіонові бактерії в продукти харчування з метою підвищення життєздатності біфідобактерій, особливо до ферментованого молока, що містить ці бактерії.

Крім того, слід зазначити, що з патенту US-A-4 8063689 вже відома дієтична таблетка, створена на основі харчових волокон, зокрема яблучних волокон, які можуть містити біфідобактерії, а також, у меншій кількості, пропіонові бактерії, що діють як протигрибковий агент.

На основі цих попередніх відкриттів і виникла ідея даного винаходу, а саме – ідея пошуку шляхів безпосереднього вживання великої кількості комбінованих біфідоферментів та пропіонових ферментів у межах вимірюваної дози, яку можна легко проковтнути.

Було зрозуміло, що такий спосіб споживання має переваги у багатьох аспектах, зокрема дозволяє значною мірою знизити звичайні напади гнильних бактерій, навіть у разі можливого негативного впливу, беручи до уваги велику кількість вуглекислоти, що вивільнюється внаслідок пропіонової ферментації, як це відбувається при утворенні цими ферментами порожнин у сирі.

Отже, задачею даного винаходу є забезпечення легко засвоюваної дієтичної композиції для поліпшення біологічної рівноваги флори травного тракту людини та інших ссавців, яка характеризується тим, що складається з безводного препарату, що містить пропіонові бактерії та біфідобактерії у кількості принаймні 10^9 клітин на грам, в оптимальному варіанті – у межах від 10^{10} до 10^{12} клітин на грам, тобто високу концентрацію бактерій.

Взагалі ці бактерії мають бути живими, але можуть бути і вбитими, якщо вжито заходи по збереженню вмісту в них ферментів.

В оптимальному варіанті ці бактерії мають бути в такому співвідношенні: від 80 до 99% пропіонових бактерій та від 20 до 1% біфідобактерій.

Таким чином, композиція згідно з даним винаходом містить у середньому вдесятеро більше пропіонових бактерій, ніж біфідобактерій.

Використовувані біфідобактерії належать, як правило, до роду *Bifidobacterium* і в оптимальному варіанті відбираються зі штамів *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis* та *B. pseudolongum*.

Пропіонові бактерії також, як правило, належать до родів *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jensenii* або *Propionibacterium acidipropionici*.

Ці бактерії можуть використовуватися як чистий штам або, краще, як суміш штамів; що стосується пропіонових бактерій, то перевагу віддають одночасному поєднанню високоаутолітичних і не дуже аутолітичних штамів.

Винахід також стосується використання безводного препарату, що містить пропіонові бактерії у кількості принаймні 10^9 клітин на грам, в оптимальному варіанті – у межах від 10^{10} до 10^{12} клітин на грам, для отримання легко засвоюваної дієтичної композиції для поліпшення біологічної рівноваги флори травного тракту людини та інших ссавців, зокрема для збільшення популяції біфідобактерій.

Слід зазначити, що ця популяція біфідобактерій може походити або від ендогенних бактерій, або від екзогенних бактерій, доданих до препарату.

Ця композиція в оптимальному варіанті існує у формі окремих фракцій у кількості приблизно від 100 мг до 1 г, краще – від 200 до 500 мг, і містить необхідну для щоденного вживання дозу бактерій.

Ці фракції призначаються або для безпосереднього перорального приймання, або їх спочатку розріджують у рідині; вони можуть мати будь-яку зручну для такого приймання форму: таблеток, пакетів-саше гранульованого або негранульованого порошку тощо.

Було підтверджено, що такі концентровані безводні препарати пропіонових бактерій, що зберігалися протягом двох років при $+4^{\circ}\text{C}$, виявляють таке зниження концентрації, яке не перевищує натуральний логарифм.

Досвід переконує, що найкращою формою є капсули, як гастрорезистентні, так і інші.

Згідно з ще одним критерієм винаходу кожна окрема фракція містить принаймні 10^9 бактерій, в оптимальному варіанті – у межах від 10^{10} до 10^{12} бактерій.

Слід зазначити, що при мінімальній концентрації бактерій, що становить 10^9 , не завжди можна досягти бажаного ефекту; це, очевидно, відбувається через те, що у цьому разі бактерії руйнуються шлунковою кислотністю або жовчними солями, перш ніж досягнуть ободової кишки.

Таким чином, згідно з даним винаходом кожній людині пропонується щоденно вживати разом з харчовими продуктами дозу пропіонових бактерій, яка приблизно становить одну тисячну частину від усієї флори травного тракту (близько 10^{14} одиниць); така кількість є значно вищою порівняно з раніше запропонованою для інших типів бактерій.

Було підтверджено, що така доза згідно з даним винаходом не має шкідливого впливу й крім вищезгаданих переваг дає такі:

- помітне зниження продукування газів з неприємним запахом, характерних для гнильних бактерій;
- зміну кольору та запаху ступу.

Ці відкриття, безперечно, також висвітлюють "симбіотичну" дію пропіонових бактерій та біфідобактерій, коли пропіонові бактерії стимулюють розвиток біфідобактерій.

Цей результат було підтверджено дослідженням, проведеним з метою з'ясування, чи насправді штами *Propionibacterium* здатні сприяти адаптації штаму *Bifidobacterium bifidum* у травному тракті мишей або підвищувати рівень їх активності у різних сегментах травного тракту.

У початковій фазі це дослідження показало, що неможливо досягти довготривалої адаптації *Propionibacterium* у травному тракті мишей, навіть мишей стерильних, тобто у яких відсутня флора травного тракту.

І навпаки, було продемонстровано, що додавання культури *Propionibacterium* до питної води для цих мишей дозволяє стимулювати утворення штамом *Bifidobacterium bifidum* колоній у травному тракті.

Таким чином, це наукове дослідження доводить існування прямої синергії між дією пропіонових бактерій та дією біфідобактерій.

Крім того, ці результати були підтверджені серією дослідів, проведених як *in vivo* на здоровій людині, так і *in vitro*.

Досліди *in vivo*

Задача цих дослідів полягала у дослідженні в клінічних умовах університетської лікарні у Кані (Франція) життєздатності та колонізації штамів пропіонових бактерій у середовищі травного тракту, а також їхнього впливу на біфідофлору у групі з дев'ятнадцяти піддослідних здорових чоловіків-добровольців.

Досліди включали щоденне пероральне приймання протягом двох тижнів кожним з піддослідних капсули, що містила 5×10^{10} пропіонових бактерій, відрібраних в INRA (Національному агрономічному дослідницькому інституті) з Банку штамів, що використовуються у сиробобній промисловості і тому є абсолютно нешкідливими для людини.

Призначені пропіонові бактерії було поділено на два штами приблизно по 50% кожний, один з яких був не дуже аутолітичним, тоді як другий ставав аполітичним у шлунку та на початку тонкої кишки під дією жовчних солей.

Було здійснено дослідження фекальної флори із зразків ступу перед прийманням пропіонових бактерій для з'ясування основного стану флори, а потім під час приймання й після нього для того, щоб оцінити, як довго екзогенні бактерії спроможні вижити у травному тракті піддослідних.

Це дослідження включало підрахунок вжитих пропіонових бактерій та біфідобактерій.

На підставі цих дослідів було підтверджено, що вже з першої проби під час приймання піддослідними пропіонових бактерій популяція пропіонових бактерій у стулі значно зростала, але цей ефект був тимчасовим і тривав протягом короткого часу після припинення приймання бактерій.

Ці результати свідчать, що фракція штамів пропіонових бактерій спроможна вижити у травному тракті людини, але вони не спроможні колонізуватися там на тривалий час.

Для оцінки впливу пропіонових бактерій на популяцію біфідобактерій було також приділено увагу пробам, взятим (а) до приймання пропіонових бактерій; (б) під час їх приймання; та після приймання (дві

проби (в та г), взяті з інтервалом в один тиждень).

Слід зазначити, що показник проби (б) є середнім арифметичним показників двох проб, взятих з інтервалом в один тиждень.

Підрахунок біфідобактерій дозволив розрахувати середнє число (у натуральних логарифмах) популяцій протягом цих чотирьох періодів.

Відповідні середні значення становлять: (а) 8,40; (б) 8,90; (в) 9,43 і (г) 8,89. Еволюцію у часі досліджували з застосуванням непараметричного статистичного тесту для порівнюваних популяцій, парно-порівняльного відносного рангового тесту Вілкокса. Він показує, що під час приймання пропріонових бактерій (проба б) популяція біфідобактерій значною мірою зростає порівняно з базовим показником (проба а) ($p=0,0096$) і залишається на високому рівні при першій перевірці (проба с) після припинення їх приймання ($p=0,031$). Між кількістю біфідобактерій під час приймання пропріонових бактерій (проба б) та при вищезгаданій першій перевірці після його припинення (1 тиждень) (проба в) ($p=0,19$) немає ніякої різниці; популяція біфідобактерій знижується при другій перевірці після припинення прийому (проба г) ($p=0,049$) порівняно з першою перевіркою (проба в) і повертається до рівня, який було визначено до приймання пропріонових бактерій (проба а) ($p=0,25$), у період між другою перевіркою (проба г) та перевіркою, що їй передувє (проба в).

Ці результати показують, що приймання пропріонових бактерій у високих дозах сприяє розвитку біфідофлори; ефект був швидким, він спостерігався з самого першого тижня і тривав ще принаймні тиждень після припинення приймання пропріонових бактерій.

Досліди *in vitro*

Задача цих дослідів полягала:

- у вивченні резистентності пропріонових бактерій до травних "стресів", тобто шлункової кислотності та жовчних солей,

- у вивченні ефекту, який справляють пропріонові бактерії на розвиток біфідобактерій,

- у виявленні, якщо можливо, агента, який відповідає за цей ефект.

Резистентність пропріонових бактерій до травного "стресу"

Між часом приймання та часом надходження до ободової кишки, де вони контактують з бактеріями травного тракту, особливо з біфідобактеріями, пропріонові бактерії зазнають численних "стресів", що перешкоджають їхньому виживанню, головними з яких є шлункова кислотність та контакт з жовчними солями у тонкому кишечнику.

Для оцінки резистентності пропріонових бактерій до цих "стресів" було вибрано два штами, що належать до роду *Propionibacterium freudenreichii*, а саме: штам LS 410, який є не дуже аутолітичним, та штам LS 2501, який є високоаутолітичним.

рН шлунку людини, після появи у ньому харчової маси, становить від 2 до 3, а середній час, потрібний для спорожнення шлунку, становить приблизно 90 хвилин.

Для оцінки резистентності вищезгаданих штамів до шлункової кислотності ці штами піддавали тестуванню при різних рівнях рН (2, 3 та 4) протягом 90 хвилин при 37°C.

В результаті проведених спостережень було встановлено, що:

При рН 4 життєздатність двох штамів зовсім не змінюється;

При рН 3 штам LS 410 залишається неушкодженим, але штам LS 2501 виявляє невеличке зниження життєздатності; При рН 2 обидва штами практично повністю гинуть через 90 хвилин інкубації.

Резистентність двох штамів до жовчних солей при 37°C вимірювали з концентраціями жовчних кислот 1, 2 та 5г/л, що, як правило, і є концентрацією на вході до тонкої кишки.

Завдяки цим дослідом було виявлено, що при найслабшій концентрації (1г/л) штам LS 410 повністю зберігає свою резистентність навіть через 5 з половиною годин інкубації. На відміну від нього штам LS 2501 виявляє меншу резистентність.

В присутності від 2 до 5г/л жовчних кислот життєздатність двох штамів різко падає, причому штам LS 2501 є більш чутливим за штам LS 410.

Отже, ці досліді показали, що два досліджувані штами наочно демонструють велику резистентність до помірних травних "стресів". Однак більшість бактерій є неспроможними протистояти умовам граничного "стресу" причому більш чутливим штамом є високоаутолітичний (LS 2501).

Ці результати свідчать про необхідність перорального приймання великої кількості бактерій для досягнення помітного впливу на біологічну рівновагу флори травного тракту людини, щоб забезпечити потрібне виживання штамів на вході до ободової кишки.

Вплив культур пропріонових бактерій на розвиток біфідобактерій

Для здійснення цих дослідів два штами біфідобактерій, *B. longum* та *B. bifidum*, висівали в середовищі, що містило у рівних пропорціях:

- культуральний бульйон, придатний для розвитку біфідобактерій,

- культуру пропріонових бактерій (штами LS 410 або LS 2501), або молоду (48 год) і, отже, відносно нелізовану, або 11-денного віку і, отже, високолізовану; особливо це стосувалося аутолітичного штаму LS 2501.

Відповідно було помічено, що присутність молодої культури LS 410 та, меншою мірою, LS 2501, в результаті дає більш високий рівень чисельності загальної популяції *B. bifidum* наприкінці експоненціальної фази: число живих бактерій є у 3-4 рази вищим у присутності LS 410 і у 2-3 рази вищим – у присутності LS 2501.

Що стосується *B. longum*, то культура LS 410 наприкінці розвитку удвічі збільшує популяцію *B. longum*.

У випадках зі старими культурами помітний сприятливий ефект двох штамів спостерігався при розвитку *B. bifidum* під час експоненціальної фази (популяція зростала удвічі або утричі).

Отже, обидві групи випробуваних у цьому досліді пропріонових бактерій впливають на розвиток *B. Bifidum*. Їхній вплив залежить від віку культури: молоді культури викликають підвищення життєздатності

біфідобактерій наприкінці розвитку, в результаті чого популяція збільшується у 2-4 рази (більш помітний ефект при застосуванні LS 410), тоді, як старі культури діють лише на початку розвитку, скорочуючи час, необхідний для утворення популяції, але не змінюючи рівень її остаточної чисельності.

Визначення агента, відповідального за "біфідогенний" вплив

– Вплив верхніх шарів культур пропіонових бактерій

– Роль пропіонової кислоти

Було проведено експерименти, подібні до згаданих вище, з використанням, по-перше, лише верхніх шарів культур, що складають позаклітинні фракції бактерій і, по-друге, контрольного середовища з пропіоновою кислотою.

Відповідно було помічено, що верхні шари культури пропіонових бактерій порівняно з контролем мають помітний стимулюючий вплив на розвиток *B. Bifidum* (підвищення життєздатності бактерії у 3-4 рази через 9 годин у культурі); цей ефект є більш виразним наприкінці розвитку зі штамом LS 2501.

Було підтверджено, що ці стимулюючі ефекти частково зумовлені впливом пропіонату. Однак виявляється, що не лише пропіонат відповідає за ці ефекти, особливо у випадку зі штамом LS 2501.

Пропіонова кислота справляє стимулюючий ефект на метаболічну активність *B. longum*.

– Вплив внутрішньоклітинного середовища:

Було помічено, що присутність внутрішньоклітинного середовища двох штамів пропіонових бактерій веде до значного підвищення оптичної щільності та маси сухих клітин обох штамів біфідобактерій. Щоправда, ці ефекти, не пов'язані з активізацією розвитку *B. bifidum* або *B. Longum*, обумовлені тим, що їхня життєздатність та їхня метаболічна активність під час розвитку не змінюються.

– Вплив ізольованих стінок:

Було помічено, що ізольовані стінки пропіонових бактерій, так або інакше пдролізовані, не мають впливу на розвиток *B. longum* та *B. bifidum*.

Отже, виявляється, що ефект сприяння пропіонових бактерій розвитку біфідобактерій не пов'язаний ані з їхнім внутрішньоклітинним вмістом, ані зі стінками. Проте сполуки, відповідальні за розвиток, здебільшого містяться у внутрішньоклітинному середовищі. Однією з цих сполук є пропіонат.