

(19)



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

(11) 1014166

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1014166

(51) Int.Cl.⁷
C12N1/20, C12N1/04

(22) Ingediend: 25.01.2000

(30) Voorrang:
25.01.1999 JP 1517799

(41) Ingeschreven:
27.07.2000 I.E. 2000/10

(47) Dagtekening:
23.10.2003

(45) Uitgegeven:
05.01.2004 I.E. 2004/01

(73) Octrooihouder(s):
BHPH Company Limited te Nassau, Bahama's
(BS).

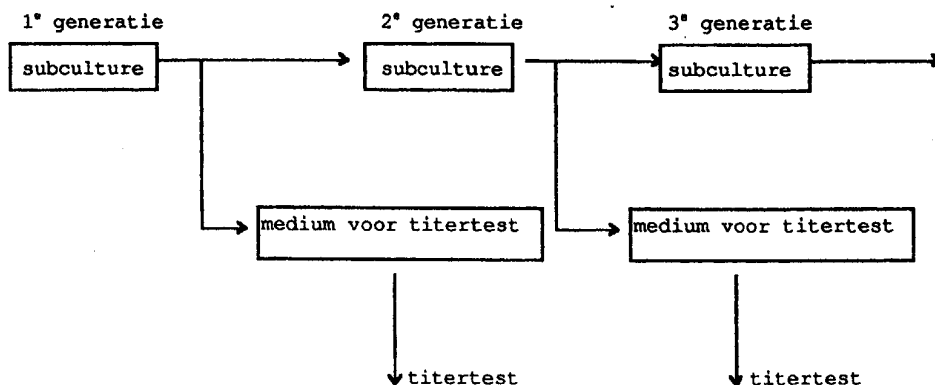
(72) Uitvinder(s):
Tadayo Hata te Osaka (JP)
Toshiyuki Maruoka te Osaka (JP)

(74) Gemachtigde:
Mr. Ir. A.W. Prins c.s. te 2508 DH Den Haag.

(54) Kweekmedium voor kweken van *Lactobacillus clearans* en werkwijze voor conserveren van genoemde stam.

(57) De kweek en de conservering van *Lactobacillus clearans* vereisen bijzondere aandacht omdat de titer zonder meer afneemt. Er is dienovereenkomstig een urgente behoefte aan weekmediurns en conserveringsmiddelen voor voorkomen van een dergelijke afname in bacterietiter tijdens zowel subculture als opslag. De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een kweekmedium waarbij ten minste één van of meer van natriumsulfide en ammoniak worden verlaagd door *Lactobacillus clearans* tijdens kweek met de toevoeging van ten minste één van of meer van natriumsulfide en waterige ammoniak, alsmede op een werkwijze voor conserveren van *Lactobacillus clearans* waarbij ten minste één van of meer van een zwavel-bevattend aminozuur, ovalbumine, galpoeder, trehalose, raffinose, dode gistcellen, chlorella, rijstzemelen, zemelen, sojamelk en wortelsap aanwezig is of zijn als een conserveringsmiddel rondom de bacteriën.

Correlatie tussen kweek en titertest tijdens subculture van *Lactobacillus clearans*



NL C 1014166

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

Titel: KWEEKMEDIUM VOOR KWEKEN VAN Lactobacillus clearans EN
WERKWIJZE VOOR CONSERVEREN VAN GENOEMDE STAM.

Beschrijving

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

1. Gebied van de uitvinding

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een kweekmedium
5 dat geschikt is voor kweken van Lactobacillus clearans, welke is
geïsoleerd en geselecteerd door de uitvinders, en op een werkwijze voor
conserveren van Lactobacillus clearans.

2. Beschrijving van aanverwante stand van de techniek

10 De cyclus van de natuur is er één van creatie en afbraak die
geen biologisch materiaal bespaard blijft. Moerassen, die overlopen van
slijm dat voortkomt uit de afbraak van eiwitten die in de natuur worden
vrijgegeven, worden uiteindelijk ook gezuiverd, wat mogelijk maakt dat
de aarde mooi blijft op haar eigen manier sinds het begin der tijden. De
15 mechanismen via welke dit plaatsvindt, zijn lang onbekend gebleven, maar
ervan is bekend dat ze hoofdzakelijk het gedrag van microörganismen
behelzen, wat leidde tot de huidige ontwikkeling van verscheidene
zuiveringssystemen, met daarbij geactiveerde-slib-werkwijzen en de
toepassing daarvan bij behandelingsinstallaties voor huishoudelijk
20 afvalwater en industrieel afvalwater. Gegeven de complexiteit betref-
fende de vraag welke soort eigenschappen de bacteriën karakteriseert die
zijn betrokken bij dergelijke zuivering, is het geen wonder dat verdere
gespecialiseerde analyse en bevestiging nodig zijn.

Een breed en diverse assortiment van materialen is het onderwerp van dergelijke zuivering en het zou uiteindelijk onmogelijk zijn deze alle te testen. Onze aandacht werd dienovereenkomstig geconcentreerd op geurende materialen (waarvan de meeste producten zijn van rotting en schadelijk zijn), welke zonder meer en snel d.m.v. reuk determineerbaar zijn en breed geclassificeerd worden in geurende zwavelverbindingen, geurende stikstofverbindingen en geurende koolstofverbindingen. Na aanzienlijk onderzoek hebben onderzoekingen betreffende laag-moleculaire geurende verbindingen, dat wil zeggen, geurende zwavelverbindingen zoals natriumsulfide en methylsulfide, geurende stikstofverbindingen, zoals ammoniak, indol en skatol, en geurende koolstofverbindingen, zoals azijnzuur en boterzuur, afdoende aangetoond dat de doelstellingen voldoende werden bereikt, wat mogelijk maakte dat dramatische voortgang kon worden geboekt bij onderzoek betreffende zuivering en deodorisering. Dat wil zeggen, klaringsbacteriën vangen deze geurende materialen in als voedsel, niet als gif, en gebruiken ze als celbestanddelen voor zichzelf of als een energiebron, terwijl bacteriën die een bijzonder krachtige werking hebben, een deodoriserend vermogen hebben. Een groot aantal bacteriën die dergelijke karakteristieken hebben, worden overal in de natuur aangetroffen en zijn de klok rond bezig met zuivering waarvoor ze het geschiktst zijn. Onze eigen lichamen zijn een microcosmos, waarbij het darmkanaal in het bijzonder een orgaan is dat rechtstreeks is gekoppeld met de buitenwereld als een deel van de natuurlijke omgeving zelf. Het is dienovereenkomstig niet verwonderlijk dat zich in de darmen "experts" van zuivering bevinden.

Op basis van bovenstaande bevindingen onderzochten de uitvinders enterale klaringsbacteriën onder de niet-pathogene bacteriën die in de darmen kunnen leven. Dat wil zeggen, de uitvinders richtten zich uitsluitend op het genus Lactobacillus dat overal in de natuur voorkomt, van binnenin het levende lichaam, zoals in het darmkanaal, de mond en de vagina, tot grassen, boombladeren, landbouwvruchten, gefermenteerde voedingsproducten, bodemmateriaal en rioolmateriaal. Als een gevolg bevestigden zij het bestaan van een eerder onbekende groep die tot het genus Lactobacillus behoort die in staat is een krachtig zuiverend vermogen te vertonen, in de darmen. Tot deze bacteriën behoort een aanzienlijk breed bereik van species die momenteel worden

geclassificeerd als behorend tot het genus Lactobacillus, zoals L. casei, L. salivarius, L. brevis en L. plantarum en worden gezamenlijk aangehaald als Lactobacillus clearans.

Lactobacillus clearans, welke nieuwe lactobacilli zijn die in staat zijn natriumsulfide en ammoniak te verminderen (Japanse onderzochte octrooiaanvraag (Kokoku) 4-632), zijn toepasbare bacteriën die een krachtig zuiverend vermogen vertonen in de darmen via het vermogen ervan om natriumsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylsulfide, diëthylsulfide, acetaldehyde, skatol, indol, methylamine, ethylamine, diëthylamine, triëthylamine en dergelijke te verlagen. De uitvinders vonden dienovereenkomstig dat deze species van het genus Lactobacillus in staat zijn een krachtige zuiverende werking te vertonen in de darmen, ontdekten als een resultaat van bacteriologisch onderzoek dat deze species volledig nieuwe functies hadden en hen werd een octrooi voor deze species verleend (1714431). Het is duidelijk geworden dat Lactobacillus clearans niet alleen geurende schadelijke materialen in de darmen vermindert, maar een groep zijn die darmflora vormen, welke vitaminen en aminozuren synthetiseren en de groei van externe bacteriën beheersen, wat een geweldig effect heeft op groepen zoals bacteriën die kunnen worden beschouwd als nuttige bacteriën die werking hebben die goed is voor het levende lichaam, zoals immunoactiveerwerking, karakteristiek groepen die behoren tot het genus Lactobacillus en het genus Bifidobacterium, en bacteriën die aan de andere kant kunnen worden beschouwd als schadelijk vanwege de schadelijke en pathogene aard ervan, karakteristiek groepen die behoren tot Veillonella en Clostridium, zoals Welchii, een voorts de groei van pathogene bacteriën beheersen, de toxiciteit ervan verminderen en zo voorts. Tabel 1 toont de functionele verschillen tussen Lactobacillus clearans en conventioneel bekende species van het Lactobacillus-genus.

(Tabel 1)

Vergelijking van functies tussen Lactobacillus clearans en conventionele species van het Lactobacillus-genus

Parameter	<u>Lactobacillus-clearans</u>	Conventionele species van <u>Lactobacillus</u>
Vs. enteraal rottings-, geurende, schadelijke materialen - zwavelverbindingen, stikstofverbindingen en koolstofverbindingen	Verlaagt meeste geurende schadelijke verbindingen - zwavelverbindingen, stikstofverbindingen en koolstofverbindingen - door deze te utiliseren, af te breken en te denatureren	Utiliseert geurende koolstofverbindingen en breekt deze af, maar heeft geen effect op geurende schadelijke verbindingen als zwavelverbindingen en stikstofverbindingen
Fecale deodorisering	++	- tot ±
Werking op nuttige bacteriën die algemeen in darmen aanwezig zijn • Bifidobacterium • Lactobacillus	Veroorzaakt aanzienlijke groei 2 tot 10 keer 10 tot 100 keer	Groei als individuen doorgaan met innemen 1 tot 3 keer 10 keer <
Werking op schadelijke bacteriën die algemeen in darmen aanwezig zijn • Veillonella • Clostridium	Sterk onderdrukt door aanzienlijke groei van nuttige bacteriën 1/20 tot 1/100 1/20 tot 1/100	Heeft onderdrukkende werking, maar dient niet te worden verwacht. 1 tot 1/5 1 tot 1/5
Anti-flatulente werking	++	- tot +
Voedingsvereiste	laag tot gematigd	hoog geconcentreerde voeding
Darmgroeivermogen	+	- tot +
Darm-stationaire vermogen	- tot +	-
Werking op pathogenen tijdens symbiose • Salmonella • Shigella • <u>E. coli</u> (0-157)	Worden niet-pathogeen gemaakt (S-R-omzetting) Pathogeniteit geïnactiverend na 47 ^e co-subculture Pathogeniteit geïnactiverend na 108 ^e co-subculture Pathogeniteit geïnactiverend na 18 ^e co-subculture	Geen effect Uitgeroeid tijdens strijd met pathogenen in de loop van verscheidene generaties van subculture met alle pathogenen

5

Bij beschouwing van waarom Lactobacillus clearans kon worden geproduceerd, kan het volgende worden gededuceerd. Dat wil zeggen, de

1014166

gesmolten aarde die 4.600.000.000 jaar geleden werd geboren, koelde af, waarbij waterdamp werd gevormd dat de eerste zeeën vormde. Tot dat moment was er echter nog geen zuurstof en de zee bestond uit zuur heet water dat zwavel, ijzer en dergelijke bevatte dat door magma werd geproduceerd. Organische materialen, zoals aminozuren en nucleïnezuren, werden beetje bij beetje gesynthetiseerd d.m.v. chemische reacties in de zee, welke aggregeerden en condenseerden in de vorm van oliedruppeltjes. Uiteindelijk ontstonden levensvormen van deze oliedruppeltjes en bleven groeien, waarbij deze organische materialen die in de zee accumuleerden consumeerden, tot aan de rand van uitputting. Tussen deze levensvormen verschenen echter anaërobe bacteriën die anorganische materialen konden gebruiken, zoals het in de zee opgeloste zwavel, voor verkrijgen van energie, en organische materialen vanuit kooldioxide konden synthetiseren. Deze anaërobe bacteriën evolueerden lange tijd, waarbij deze tot de eerste fotosynthetische bacteriën differentieerden die energie gebruikten om zuurstof vrij te maken, en de oude voorgangers van het Lactobacillus-genus van tegenwoordig. Deze speelden een actieve rol bij de zuivering van geurende schadelijke materialen uit magma, als gevolg waarvan de meeste schadelijke materialen naar de oceaانبodem werden geprecipiteerd, terwijl zuurstof ook toenam, wat mogelijk maakte dat een milieu dat vriendelijk voor leven was, geleidelijk verder ging te gedijen en de bouwstenen te vormen voor het navolgende explosieve fenomeen van leven. Op een moment tijdens dit proces gingen de meeste Lactobacilli ten onder in de strijd voor groei met andere bacteriën die waren geacclimatiseerd en geadapteerd voor het ruwe milieu van de onmetelijke natuur, waarbij deze ontsnapten en verbleven in nutriëntenrijke gebieden vol met de aanwezigheid van koolhydraten, aminozuren, vitamines en dergelijke, en naar gebieden met een milder, constanter milieu, waarna hun inherente zuiverende vermogen, dat wil zeggen, het zuiverende vermogen tegen geurende en schadelijke zwavelverbindingen en het zuiverende vermogen tegen geurende en schadelijke stikstofverbindingen, geleidelijk verloren gingen. Het Lactobacillus-genus heeft echter het vermogen om geurende koolstofverbindingen te utiliseren tot de dag van vandaag behouden.

Hoewel verscheidene algemeen bekende werkwijzen, zoals vriesdrogen, ultrakoude conservering of vloeibare, natte, halfdroge en droge

1014166

werkwijzen of dergelijke kunnen worden toegepast als werkwijzen voor conserveren van Lactobacillus clearans, is het uiterst belangrijk om het verlies te voorkomen van het karakteristieke vermogen van Lactobacillus clearans om geurende en schadelijke materialen te verminderen, tijdens opslag en het in belangrijkheid volgende punt is verzekeren van langer durende levensvatbaarheid terwijl dit vermogen wordt geconserveerd. Onderzoek door de uitvinders heeft duidelijk de noodzaak laten zien van bijzondere aandacht daarvoor. Dat wil zeggen, gezien de aanwezigheid van materialen die er de oorzaak van zijn dat de bacterietiter snel afneemt tijdens bacteriesubculture, zal de titer net alleen geleidelijk afnemen, maar de overleving ervan wordt zelfs bedreigd, ongeacht welke werkwijze van conservering wordt toegepast.

Vriesdrogen is momenteel de overheersende werkwijze van conserveren van bacteriën en Lactobacillus is geen uitzondering. Hoewel vriesdrogen is toegepast voor alle producten die gedurende lage tijden dienen te worden opgeslagen, zoals anti-flatulentia of yoghurtstammen, wordt de houdbaarheid van Lactobacillus in principe niet als erg goed beschouwd. Pogingen om gevriesdroogde cellen van Lactobacillus die hier en in het buitenland commercieel beschikbaar zijn, op te vangen en weer tot leven te brengen waren namelijk niet in staat de opgegeven levensvatbare-celaantallen op te leveren, bij nagenoeg alle producten, ongeacht de vervaldatum, terwijl er een aantal producten was waarin geen levensvatbare cellen werden gevonden. Dit was het geval ondanks de expertise en de resultaten van onderzoek van de fabrikanten. Onderzoekingen van de uitvinders betreffende Lactobacillus clearans onthulden dat niet alleen het levensvatbare-celaantal afnam in een vroeg stadium in de aanwezigheid van algemeen toegepaste conserveermiddelen, deze leidden zelfs tot een afname in titer.

Lactobacillus clearans kan worden beschouwd als de afstammelingen, of zogenoemde atavistisch mutantstammen, die tot de dag van vandaag hebben overleefd met de voortgaande overerving van zuiveringswerking, welke hun voorouders kosten wat kost behielden, tegen geurende zwavelverbindingen, stikstofverbindingen en koolstofverbindingen. Het is onmogelijk te voorspellen welk lot de tere Lactobacillus clearans, welke nu in een toestand van flux tussen oude en moderne Lactobacillus is, onder menselijke zorg is beschoren.

Verschillende zaken zijn nodig voor de kweekmediums die worden toegepast om dergelijke bacteriën te kweken, en voor de conserveringsmiddelen die worden toegepast om deze houdbaar te maken. Bij tests op deze bacteriën na de titer namelijk af zowel tijdens subculture als bij opslag. Als zodanig zijn de belangrijke punten welke condities van subculture mogelijk zouden maken dat de krachtige titer onaangetast blijft en welke condities van opslag mogelijk zouden maken dat de krachtige titer onaangetast blijft.

10 SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

Als een resultaat van uitgebreid onderzoek om deze problemen te verhelpen hebben de uitvinders een kweekmedium ontwikkeld dat in staat is de titer van Lactobacillus clearans te onderhouden, bij verlagen van natriumsulfide en ammoniak, en een werkwijze van conservering. Dat wil zeggen, de uitvinding is een kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van natriumsulfide en waterige ammoniak, zodat tijdens de kweek van de Lactobacillus clearans ten minste één van of meer van natriumsulfide en ammoniak wordt verlaagd door Lactobacillus clearans na 24 uur kweek, en is een kweekmedium dat bij voorkeur de toevoeging omvat van natriumsulfide in een concentratie van 500 p.p.m., waarbij de natriumsulfide met 10% of meer wordt verlaagd na 24 uur kweek tijdens de kweek van Lactobacillus clearans, en bij voorkeur de toevoeging omvat van waterige ammoniak in een concentratie van 500 p.p.m., waarbij de ammoniak met 10% of meer wordt verlaagd na 24 uur kweek tijdens de kweek van Lactobacillus clearans. Het kweekmedium omvat bij voorkeur de toevoeging van ten minste één of meer van geurende zwavelverbindingen, geurende stikstofverbindingen en geurende koolstofverbindingen, waarbij de geurende zwavelverbinding bij voorkeur ten minste één van of meer is van natriumsulfide, waterstofsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylmercaptan, dimethylsulfide, dimethyldisulfide, diëthylsulfide, dibutylsulfide en derivaten daarvan, de geurende stikstofverbinding bij voorkeur één of meer is van ammoniak, skatol, indol, acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine, triëthylamine en derivaten daarvan en de geurende koolstofverbinding bij voorkeur ten minste één of meer is van mierzuur, azijnzuur, propionzuur,

boterzuur, formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, fenol, butylalcohol, amylalcohol en derivaten daarvan. Het kweekmedium omvat bij voorkeur ook de toevoeging van ten minste één of meer van zwavel-bevattend aminozuur, glutaminezuur, lysine en asparaginezuur als
5 een aminozuur, bij voorkeur de toevoeging van ten minste één of meer van vitamine C, vitamine E, vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur en nicotinamide als een vitamine, bij voorkeur de toevoeging van ten minste één of meer van mangaan, zink, magnesium en molybdeem als een mineraal-
bestanddeel en bij voorkeur de toevoeging van ten minste één of meer van
10 chlorella-CGF, sojamelk en galpoeder.

De tweede van de onderhavige uitvindingen is een werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans, welke de aanwezigheid omvat van ten minste één of meer van zwavel-bevattend aminozuur, ovalbumine, galpoeder, trehalose, raffinose, dode gistcellen, chlorella,
15 rijstezemelen, zemelen, sojamelk en wortelsap, als een conserveermiddel rondom de Lactobacillus clearans tijdens de conservering van Lactobacillus clearans en omvat bij voorkeur in toevoeging aan het voornoemde conserveermiddel de toevoeging van ten minste één of meer van glutaminezuur, lysine, asparaginezuur, vitamine C, vitamine E,
20 vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur, nicotinamide, mangaan, zink, magnesium, molybdeem, natriumsulfide, waterstofsulfide, ammonium-sulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylmercaptan, dimethyl-sulfide, dimethyldisulfide, diëthylsulfide, dibutylsulfide, ammoniak, skatol, indol, acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine,
25 triëthylamine, mierzuur, azijnzuur, propionzuur, boterzuur, formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, fenol, butylalcohol, amylalcohol en derivaten daarvan, rondom de Lactobacillus clearans, en omvat voorts bij voorkeur de aanwezigheid van ten minste één of meer van dier-afgeleide poedertaptemelk, ovalbumine, lactose,
30 leverextractpoeder en serum, alsmede ten minste één of meer van planten-afgeleide sojawei, trehalose, raffinose, zetmeel, chlorella, chlorella-CGF, rijstezemelen, zemelen, alfalfasap, klaversap, tarwekiemextract, sojamelk, tomatensap, wortelsap, druivensap, aloëpoeder, groene-theepoeder en dode gistcellen als een conserveermiddel en in toevoeging
35 aan de voornoemde conserveermiddelen, de toevoeging van ten minste één of meer van glutaminezuur, lysine, asparaginezuur, vitamine C,

vitamine E, vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur, nicotinamide, mangaan, zink, magnesium, molybdeem, natriumsulfide, waterstofsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylmercaptan, dimethylsulfide, dimethyldisulfide, diëthylsulfide, dibutylsulfide, ammoniak, skatol, acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine, triëthylamine, mierzuur, azijnzuur, propionzuur, boterzuur, formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, fenol, butylalcohol, amylalcohol en derivaten daarvan rondom de Lactobacillus clearans. Bovendien kan de werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans elk van vriesdroog-, ultrakoude-conserverings- of vloeibare, natte, halfdroge of droge werkwijzen omvatten.

KORTEBESCHRIJVING VAN DE TEKENINGEN

FIG. 1 is een illustratie van kweek met het kweekmedium voor Lactobacillus clearans en de titertest daarbij.

BESCHRIJVING VAN DE VOORKEURSUITVOERINGSVORMEN

De bij de onderhavige uitvinding aangehaalde Lactobacillus clearans vormen nieuwe stammen van het Lactobacillus-genus die de volgende biochemische karakteristieken (1), (2), (3) en (4) hebben. Deze zijn namelijk stammen van Lactobacillus: (1) die zowel Na₂S·9H₂O als NH₄OH kunnen verlagen als 0,5 g Na₂S·9H₂O en/of 0,5 ml NH₄OH wordt of worden toegevoegd aan 5 g vleesextract, 5 g pepton, 1 g glucose, 1 g CaCO₃ en 1 L water (neutrale pH); (2) die geen groei-bevorderende uitwerking vertonen zelfs als 0,5 g Na₂S·9H₂O en/of 0,5 ml NH₄OH wordt of worden toegevoegd tijdens de logaritmische fase tijdens kweek van de bacteriën in medium dat 1 g casaminozuur en vitaminen (A: 900 IE; B₁: 1 mg; B₂: 1 mg; B₆: 1 mg; B₁₂: 5 γ; nicotinamide: 16 mg; calcium-pantothenaat: 8 mg; C: 64 mg; D₂: 120 IE) omvat in Stephanson-Whetham-medium (afgekort als S-W; 1 g KH₂PO₄, 0,7 g MgSO₄·7H₂O; 1 g NaCl; 4 g (NH₄)₂PO₄; 0,03 g FeSO₄·H₂O; 5 g glucose); (3) natuurlijke geïsoleerde stammen vertonen sterkere weerstand dan conventioneel bekende lactobacilli en zwakkere weerstand dan Lactobacillus clearans tegen Na₂S·9H₂O en (4) die gram-positief zijn, staafjes, niet-beweeglijk, catalase-negatief, met geen reductie van nitraten, geen afbraak van

gelatine, geen vorming van indol of waterstofsulfide en hoog vermogen om melkzuur te vormen uit glucose en lactose, alsmede versnelde groei met de toevoeging van azijnzuur (Japanse onderzochte octrooiaanvraag (Kokoku) 4-632).

- 5 De verscheidene mediums die in Tabellen 2, 3, 4, 5 en 6 worden gegeven, zoals de verscheidene types medium die in lage-concentratie-nutriëntenmedium, moderate-concentratie-nutriëntenmedium en hoge-concentratie-nutriëntenmedium worden geclassificeerd, kunnen worden toegepast voor de subculture van Lactobacillus clearans.

10

(Tabel 2)

Subculturemediumsamenstelling (1) (samenstelling in 1 L)

Stephanson-Wetham-medium

KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03 g
Glucose	5 g

15

(Tabel 3)

Subculturemediumsamenstelling (2) (samenstelling in 1 L)

MRS-medium

Vleesextract	10 g
Gistextract	5 g
Pepton	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 g
Natriumacetaat	5 g
Ammoniumcitraat	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Glucose	20 g

20

(Tabel 4)

Subculturemediumsamenstelling (3) (samenstelling in 1 L)

Lage-concentratie-nutriëntenmedium

Medium	Samenstelling
a-1	1 g casaminozuur toegevoegd aan Stephanson-Wethman-medium
a-2	1 g gistextract toegevoegd aan Stephanson-Wethman-medium
a-3	1 g casaminozuur 0,1 g vitamine ¹⁾ toegevoegd aan Stephanson-Wethman-medium

- 5 ¹⁾ bevat vitamine A: 900 IE; vitamine B₁: 1 mg; vitamine B₂: 1 mg, vitamine B₁₂: 5 µg; nicotinamide: 16 mg; calciumpantothenaat: 8 mg; vitamine C: 16 mg; Vitamine D₂: 120 IE in 1 g.

(Tabel 5)

- 10 Subculturemediumsamenstelling (4) (samenstelling in 1 L)

moderate-concentratie-nutriëntenmedium

Medium	Samenstelling
b-1	1 g casaminozuur 0,1 g vitamine ¹⁾ 5 g taptemelk toegevoegd aan Stephanson-Wethman-medium
b-2	5 g vleesextract 5 g pepton 5 g glucose
b-3	1 g MRS-medium, 1/2 verdund

- ¹⁾ bevat vitamine A: 900 IE; vitamine B₁: 1 mg; vitamine B₂: 1 mg, vitamine B₁₂: 5 µg; nicotinamide: 16 mg; calciumpantothenaat: 8 mg; vitamine C: 16 mg; Vitamine D₂: 120 IE in 1 g.

15

(Tabel 6)

Subculturemediumsamenstelling (5) (samenstelling in 1 L)

Hoge-concentratie-nutriëntenmedium

Medium	Samenstelling
c-1	MRS-medium
c-2	100 g taptemelk
c-3	30 g taptemelk toegevoegd aan MRS-medium

20

De werkwijze van testen van de titer van Lactobacillus clearans wordt hieronder beschreven; het volgende zijn voorbeelden van de functies die deze bacteriën hebben: (1) het vermogen geurende schade-

lijke materialen te verminderen, zoals de zwavelverbinding natrium-
sulfide en de stikstofverbinding ammoniak; (2) het vermogen de darmflora
te verbeteren, dat wil zeggen, het vermogen nuttige bacteriën, zoals
Bifidobacterium en Lactobacillus, te verhogen en duidelijk verlagen van
5 schadelijke bacteriën, zoals *Veillonella* en *Clostridium*, met daarbij
Welchii; en (3) het vermogen de groei en toxiciteit van infectieuze
pathogene darmbacteriën te onderdrukken. Hoewel deze drie vermogens
afzonderlijk getest en uitvoerig geëvalueerd kunnen worden, hebben de
resultaten van uitgebreid onderzoek laten zien dat de voornoemde
10 vermogens van Lactobacillus clearans onderling nauw zijn gerelateerd.
Als zodanig werd de test van de titer beperkt tot (1) het vermogen voor
verlagen van geurende schadelijke materialen in de darm, wat eenvoudig
getest wordt en snelle resultaten verschaft.

Het titertestmedium voor testen van het vermogen om geurende
15 schadelijke materialen in de darm te verlagen bestond uit 0,5 g
natriumsulfide of 0,5 ml waterige ammoniak toegevoegd aan medium dat 5 g
vleesextract, 5 g pepton, 5 g glucose, 3 g natriumbutyrat en 3 g
calciumcarbonaat omvatte. Het medium werd met de testbacterie
geïnoculeerd voor anaërobe kweek bij 37°C en de afname in de toegevoegde
20 natriumsulfide of ammoniak in de tijd werd bepaald. Op dergelijke tijden
werd de natriumsulfide gemeten d.m.v. de loodacetaatwerkwijze of de
joodtitratiewerkwijze in JIS K 0102-1985, terwijl de ammoniak werd
gemeten d.m.v. Nestler's werkwijze of de indofenolblauwabsorptie-
werkwijze in JIS K 0102-1985. De Lactobacillus clearans die wordt
25 getest, is uiterst divers; Tabel 7 geeft het percentage afname in
natriumsulfide en ammoniak bepaald als de titer van de drie
karakteristieke stammen, namelijk BHPH-L-1 (FERM P-17149, FERM BP-6971),
BHPH-L-2 (FERM P-17148, FERM BP-6972) en BHPH-L-3 (FERM P-17150,
FERM BP-6973), hoog was.

(Tabel 7)

Percentage afname in natriumsulfide en ammoniak door Lactobacillus clearans met hoge titer

FERM-Nr.	Afname (%) natriumsulfide			Afname (%) ammoniak		
	24 uur	48 uur	72 uur	24 uur	48 uur	72 uur
P-17148 BP-6972	20	40	50	15	25	40
P-17149 BP-6971	30	50	55	25	40	50
P-17150 BP-6973	40	65	70	30	45	65

5

Het basiskweekmedium heeft in het ideale geval uitstekende groei en minimale afname in titer. Dit is het belangrijkste punt in verband met de opbrengst van bacteriën van uit het praktische standpunt van massale kweek (opschaling). Na zoeken van een ideaal kweekmedium hebben met succes de sleutel gevonden. Dat wil zeggen, zoals in Tabel 8 wordt aangegeven, dat het duidelijk werd dat als kweek werd gedaan met de toevoeging van natriumsulfide of ammoniak aan het basismedium, het essentieel was dat de twee toegevoegde materialen in enige mate werden verlaagd na 24 uur, waarbij subcultures in mediums zonder een dergelijke afname resulteerden in een aanzienlijk verlies van titer, wat deze uiteindelijk ontoepasbaar maakte. Dat wil zeggen, Tabel 8 toont dat in gevallen waarbij 0,5 g natriumsulfide en 0,5 ml waterig ammoniak werden toegevoegd aan 1 liter medium, de geurende materialen die als inherente nutriëntbestanddelen dienden, zoals geurende zwavel-, stikstof- en koolstofmaterialen, niet werden gebruikt als nutriëntenbronnen bij overmatig hoog geconcentreerde nutriëntenmediums en dat alleen gemakkelijk te gebruiken nutriëntenbronnen werden gebruikt, wat resulteerde in grotere hoeveelheden van een bacterie, maar met het geleidelijke verlies en de uiteindelijke inactivering van de bacteriekaracteristieken. Hier verwijst waterig ammoniak naar waterig reagensammoniak, zoals een waterige oplossing die 25,0 tot 27,9 gew./V-% ammoniak bevat.

(Tabel 8)

Percentage afname in natriumsulfide en ammoniak in kweekmediums waaraan deze werden toegevoegd voor Lactobacillus clearans.

5

Type	Medium	Toegevoegd materiaal	Test-bacterie, FERM-Nr.	Aanvankelijke afname (%)					
				Geurende zwavel-verbindingen			Geurende stikstof-verbindingen		
				24 uur	48 uur	72 uur	24 uur	48 uur	72 uur
Lage-concentratie-medium	a-1	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	10	15	25	10	20	30
			P-17149, BP-6971	15	20	35	15	30	40
			P-17150, BP-6973	20	30	40	20	35	45
	a-2	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	10	15	25	10	15	20
			P-17149, BP-6971	15	20	30	15	25	40
			P-17150, BP-6973	25	35	40	20	30	40
	a-3	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	15	25	30	15	25	35
			P-17149, BP-6971	20	30	35	20	30	40
			P-17150, BP-6973	25	35	10	20	35	45
Moderate-concentratie-medium	b-1	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	10	15	25	10	15	20
			P-17149, BP-6971	15	20	30	15	20	30
			P-17150, BP-6973	20	25	30	15	20	25
	b-2	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	0	3	10	10	0	10
			P-17149, BP-6971	0	5	10	0	5	10
			P-17150, BP-6973	0	5	15	0	5	10
	b-3	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	5	10	15	5	7	10
			P-17149, BP-6971	5	10	15	5	8	10
			P-17150, BP-6973	5	7	10	5	7	10
Hoge-concentratie-medium	c-1	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	0	2	7	0	3	5
			P-17149, BP-6971	0	0	3	0	0	2
			P-17150, BP-6973	2	3	5	2	5	7
	c-2	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	0	0	8	0	0	5
			P-17149, BP-6971	0	0	10	0	0	5
			P-17150, BP-6973	0	0	7	0	0	5
	c-3	Natriumsulfide en waterige ammoniak	P-17148, BP-6972	0	0	5	0	0	5
			P-17149, BP-6971	0	0	5	0	0	5
			P-17150, BP-6973	0	0	10	0	0	5

De belangrijkste aminozuren die de bacteriecellen of enzymen uitmaken, werden onderzocht op het type effect ervan op Lactobacillus clearans. Onthuld werd dat de toevoeging van bijzondere aminozuren, namelijk zwavel-bevattende aminozuren als cystine, methionine, cysteïne en taurine, alsmede glutaminezuur, lysine en asparaginezuur, uiterst werkzaam waren als deze tijdens subculture werden toegevoegd, terwijl de toevoeging van proline, tyrosine en dergelijke een snelle afname in titer voortbracht. Dat wil zeggen dat deze ruw konden worden geclassificeerd in drie groepen: bepaalde types aminozuren die de titer

van Lactobacillus clearans hielpen behouden, andere types die minder effect hadden, en nog weer andere types die een aanzienlijke afname in titer voortbrachten. Dit loste met succes de tegenspraak op bij conventionele experimenten, in het bijzonder de tegenspraak dat als een
5 nutriënt werd verbeterd in een poging de groei van bacteriën te faciliteren, het nutriënt uitstekend voor de bacteriën zou zijn, terwijl toch de onderscheidende karakteristieken van verlagen van schadelijke materialen verloren zou gaan. Dienovereenkomstig hoeft nauwelijks te worden opgemerkt dat de voornoemde werkzame aminozuren gemengd zouden
10 kunnen worden met de voornoemde geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen om te voorkomen dat de titer verder afneemt.

Wij zochten naar materialen die in staat waren tot dergelijke verbetering of potentiëring en voerden uitgebreid onderzoek uit. Als gevolg hebben wij ontdekt dat vitamine C, vitamine E, vitamine B₁₂,
15 calciumpantothenaat, foliumzuur, nicotinamide en dergelijke werkzame vitaminen waren. Het is duidelijk geworden dat deze vitaminen verregaand zijn betrokken bij de productie van enzymen die geurende materialen verminderen, zoals geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen.

Tevens werd ontdekt dat mangaan, zink, magnesium, molybdeen en
20 dergelijke werkzame mineralen zijn. Duidelijk is geworden dat deze materialen verregaand zijn betrokken bij de werkzaamheid van enzymen die geurende materialen verminderen, zoals geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen.

Dit werd bevestigd door Lactobacillus clearans te kweken in
25 mediums die de voornoemde werkzame vitaminen en mineralen bevatten, en vervolgens de bacteriën te verwijderen en vervolgens eenvoudig een gedeelte van de resulterende kweekbouillon toe te voegen aan een vloeistof die een geurend materiaal, zoals een geurende zwavel-, stikstof- of koolstofverbinding, bevatte, wat resulteerde in de afname
30 van dergelijke geurende materialen.

Tevens werd ontdekt dat chlorella-CGF, sojamelk, galpoeder en dergelijke werkzame materialen zijn voor onderhouden van de titer van Lactobacillus clearans.

In toevoeging aan onderzoeken van kweekcomponenten heeft het ook
35 de voorkeur om bacteriën in subculture te kweken in de logaritmische fase in navolgende mediums tijdens subculture of kweek in een poging een

afname in de titer te voorkomen. Het heeft tevens de voorkeur hittedenaturatie van de mediumbestanddelen tijdens de vervaardiging en sterilisatie van het medium te voorkomen.

Een werkwijze van conservering werd vervolgens onderzocht, wat
5 resulteerde in de conclusie dat het belangrijkste punt is eerst een
gunstig conserveermiddel te bereiden. Conserveermiddelen die algemeen
bij lactobacilli worden toegepast momenteel, zoals lactose, verscheidene
types zetmeel en taptemelk (1) zijn gemakkelijk te hanteren, (2) zijn
goedkoop, (3) kunnen rechtstreeks aan het levende lichaam worden
10 toegediend en leveren geen ongemak als deze worden genomen. Vanwege deze
en andere redenen is er een sterke neiging deze toe te passen,
hoofdzakelijk voor menselijk gemak, niettegenstaande dat deze zowel
gunstig als ongeschikt zijn voor lactobacilli. Momenteel kunnen deze
worden genomen in de vorm van enterocapsules, maar wij hebben besloten
15 deze omstandigheden vanuit het gezichtspunt van lactobacilli te
bespreken, zonder prioriteit aan de kant van mensen te geven, als een
wijze om aandacht te vestigen op de lactobacilli. Dienovereenkomstig
werd een grote verscheidenheid materialen getest als conserveermiddelen,
van algemeen toegepaste eiwit-gebaseerde materialen bij bacteriekweken,
20 tot samenstellingen van verscheidene dierlijke en plantaardige
materialen en sacchariden, voor een grote verscheidenheid van bacterie-
stammen, met daarbij de drie karakteristieke stammen van Lactobacillus
clearans, dat wil zeggen, BHPH-L-1 (FERM P-17149, FERM BP-6971),
BHPH-L-2 (FERM P-17148, FERM BP-6972) en BHPH-L-3 (FERM P-17150, FERM
25 BP-6973). De hoeveelheden waarmee de conserveermiddelen worden
toegevoegd, wisselt in hoge mate afhankelijk van het type
conserveermiddel, met een wisselend bereik van geschiktheid en kan
dienovereenkomstig niet worden vastgesteld als een zaak van absoluut
beginsel, maar ligt in het algemeen in het bereik, in termen van de
30 gewichtsverhouding van vaste conserveermiddelstoffen, lopend van 1 tot
500 keer dat van gecentrifugeerde bacteriecellen.

De bij de onderhavige uitvinding aangehaalde zetmelen worden
niet beperkt tot een bijzonder uitgangsmateriaal, maar tot voorbeelden
behoren oplosbaar zetmeel, maïszetmeel, aardappelzetmeel en zoete-
35 aardappelzetmeel.

De bij de onderhavige uitvinding aangehaalde dode gistcellen verwijzen naar gist in een niet-levensvatbare toestand. Een voorbeeld is bakkersgist dat kan worden gedood door 10 minuten behandeling met 100°C heet water en daarna gedroogd. Na te zijn gedood kan bakkersgist echter
5 in een droge of een vochtige toestand zijn. Gistextractpoeder verwijst naar gistextract dat is gedroogd en tot een poeder is verwerkt. De droogwerkwijze wordt niet in het bijzonder beperkt.

Voorbeelden

10 Lactobacillus clearans werd in subculture gebracht in de verschillende in Tabellen 2, 3, 4, 5 en 6 gegeven mediums, mediums voor testen van de titer werden in elk stadium van de subculture geïnoculeerd en de titer werd getest vanaf de eerste tot en met de negende generatie. De werkwijze wordt geïllustreerd in FIG. 1, de resultaten van de
15 titertest worden gegeven in Tabel 9 en Tabel 10 brengt al de stammen bijeen. De titer wordt weergegeven d.m.v. concentrische cirkels om nagenoeg geen afname in titer aan te geven, d.m.v. een cirkel om een lichte afname, maar voldoende behoud van titer aan te geven, d.m.v. een driehoekje om een geleidelijk verlies in titer, wat ongeschikt was voor
20 de praktijk, aan te geven en d.m.v. een "x" om een aanzienlijk verlies van titer aan te geven. In de grond van de zaak werd een afname in titer opgemerkt bij alle mediums, toenemend in de volgorde van lage-concentratie-, naar moderate-concentratie- naar hoge-concentratie-nutri-entenmediums. De verschillend namen snel toe met verdere subcultures

25

Tabel 9: Correlatie tussen aantal subcultures en titer van Lactobacillus clearans in verscheidene mediums

Type	Medium	Test-bacterie, FERM-Nr.	Afname (%) na 72 uur in 1 ^e gene- ratie		Aantal subcultures en titer			
			S ¹⁾	N ²⁾	1*	3*	6*	9*
Lage- concen- tratie- medium	a-1	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	0	O~Δ
		P-17149, BP-6971	50	45	⊙	⊙	0	O~Δ
		P-17150, BP-6973	65	60	⊙	⊙~O	0	Δ
	a-2	P-17148, BP-6972	45	35	⊙	⊙	0	O~Δ
		P-17149, BP-6971	45	40	⊙	⊙~O	0	Δ
		P-17150, BP-6973	60	55	⊙	⊙~O	0	Δ
	a-3	P-17148, BP-6972	45	35	⊙	⊙	0	O~Δ
		P-17149, BP-6971	45	40	⊙	⊙~O	0	Δ
		P-17150, BP-6973	55	50	⊙	⊙~O	O~Δ	Δ
Mode- rate- concen- tratie- medium	b-1	P-17148, BP-6972	40	30	⊙	0	O~Δ	Δ
		P-17149, BP-6971	40	40	⊙	0	O~Δ	Δ
		P-17150, BP-6973	50	45	⊙	0	O~Δ	Δ
	b-2	P-17148, BP-6972	75	30	⊙	O~Δ	Δ~X	Δ~X
		P-17149, BP-6971	30	35	⊙	O~Δ	Δ	Δ~X
		P-17150, BP-6973	40	45	⊙	O~Δ	Δ	X
	b-3	P-17148, BP-6972	40	35	⊙	0	O~Δ	Δ
		P-17149, BP-6971	40	45	⊙	0	O~Δ	Δ
		P-17150, BP-6973	60	50	⊙	0	O~Δ	Δ
Hoge- concen- tratie- medium	c-1	P-17148, BP-6972	35	30	0	0	Δ	Δ~X
		P-17149, BP-6971	35	40	0	O~Δ	Δ	Δ~X
		P-17150, BP-6973	50	50	⊙	0	Δ	Δ~X
	c-2	P-17148, BP-6972	30	30	0	Δ	X	X
		P-17149, BP-6971	25	20	0	Δ	X	X
		P-17150, BP-6973	30	35	Δ	Δ~X	X	X
	c-3	P-17148, BP-6972	30	30	0	Δ~X	X	X
		P-17149, BP-6971	35	30	0	Δ	X	X
		P-17150, BP-6973	45	45	0	Δ	Δ	X

5

- 1) geurende zwavelverbindingen;
- 2) geurende stikstofverbindingen

(Tabel 10)

Lactobacillus-clearans-kweek en algehele correlatie van subcultures en titer

	Aantal subcultures en uitgebreidheid van titer			
	1°	3°	6°	9°
Lage-concentratie-nutriënten-medium	⊙	⊙~O	O~Δ	O~Δ
Moderate-concentratie-nutriëntenmedium	⊙~O	O~Δ	O~X	Δ~X
Hoge-concentratie-nutriënten-medium	⊙~Δ	O~X	Δ~X	Δ~X

5

Gezien de karakteristieken ervan werd Lactobacillus clearans in subculture gebracht met de toevoeging van de enterale rottings-, geurende materialen die geurende zwavel-, stikstof- en koolstof-
 10 verbindingen omvatten, toegevoegd aan lage-concentratie-, moderate-concentratie- en hoge-concentratie-nutriëntenmediums, werden de bacteriën overgeplant naar mediums voor testen van de titer en werd de titer getest, met de in Tabel 11 gegeven resultaten. Hier zijn F-bestanddelen degene waartoe 0,2 g methylsulfide, 0,3 g skatol en 1 g
 15 boterzuur per liter medium behoren. Behalve F-componenten konden enterale rottings-, geurende materialen die geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen omvatten, zoals natriumsulfide, mercaptan, indol, azijnzuur en propionzuur, worden gekozen voor de test zonder belangrijke verschillen in de resultaten

20

(Tabel 11)

Correlatie tussen aantal subcultures en titer van Lactobacillus clearans in medium dat F-bestanddelen bevat.

Type	Medium	Toegevoegd materiaal	Test-bacterie, FERM-Nr.	Afname (%) na 72 uur in 1 ^e generatie		Aantal subcultures en titer			
				S ¹⁾	N ²⁾	1*	3*	6*	9*
Lage-concentratie-medium	a-1	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	⊙~O	O
			P-17149, BP-6971	55	50	⊙	⊙	⊙~O	O
			P-17150, BP-6973	70	65	⊙	⊙	⊙~O	⊙~O
	a-2	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	⊙~O	O
			P-17149, BP-6971	50	75	⊙	⊙	⊙~O	O
			P-17150, BP-6973	65	60	⊙	⊙	⊙~O	O
	a-3	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	⊙~O	O
			P-17149, BP-6971	50	50	⊙	⊙	⊙~O	O~Δ
			P-17150, BP-6973	65	60	⊙	⊙	⊙~O	O~Δ
Middel-concentratie-medium	b-1	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	O	O~Δ
			P-17149, BP-6971	50	45	⊙	⊙	O	O~Δ
			P-17150, BP-6973	60	60	⊙	⊙	O	O~Δ
	b-2	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	O	O~Δ	Δ
			P-17149, BP-6971	55	50	⊙	⊙	O	O~Δ
			P-17150, BP-6973	65	60	⊙	⊙	O~Δ	O
	b-3	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	⊙	⊙	O	O
			P-17149, BP-6971	50	50	⊙	⊙	O	O~Δ
			P-17150, BP-6973	65	60	⊙	⊙	⊙~O	O
Hoge-concentratie-medium	c-1	F-componenten	P-17148, BP-6972	50	40	O	O	O~Δ	Δ~X
			P-17149, BP-6971	50	45	O	O	Δ	Δ~X
			P-17150, BP-6973	60	60	⊙	O	O~Δ	Δ
	c-2	F-componenten	P-17148, BP-6972	45	35	⊙~O	O	Δ~X	X
			P-17149, BP-6971	45	45	⊙~O	O	Δ~X	X
			P-17150, BP-6973	55	55	O	O	Δ~X	X
	c-3	F-componenten	P-17148, BP-6972	45	35	⊙	O	Δ	X
			P-17149, BP-6971	45	45	⊙	O	Δ	X
			P-17150, BP-6973	55	55	⊙~O	O	Δ	X

- 5 1) geurende zwavelverbindingen;
2) geurende stikstofverbindingen

Tabel 11 laat zien dat de toevoeging van F-bestanddelen aan het basismedium als de subculture en de kweekmedia van belang was voor voorkomen dat de Lactobacillus-clearans-titer afnam., waarbij dit in het bijzonder waar was als het basismedium een hoge-concentratie-nutriëntenmedium was. Het was ook duidelijk dat er relatief minder afname in titer was bij de derde generatie van subculture als de F-componenten werden toegevoegd. De titer nam daarna echter snel af.

15 In termen van conserveermiddelen toont Tabel 12 de veranderingen in de levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans als eiwit-aminozuur-gebaseerde conserveermiddelen werden toegevoegd, toont Tabel 13 de veranderingen in de levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans als

sacchariden en dierlijk-eiwit-vitamine-mineralen-complex-conserveermid-
delen werden toegevoegd en toont Tabel 14 de veranderingen in de
levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans als plantaardig-eiwit-
vitamine-mineralen-complex-conserveermiddelen en andere conserveer-
5 middelen werden toegevoegd. Hier verwijzen alfalfasap en klaversap naar
vloeistoffen die worden gemaakt door 10-voudig water toe te voegen aan
alfalfagras of klavergras voor maken van een sap, waarbij deze
respectievelijk worden toegepast als alfalfasap of klaversap. De
hoeveelheden waarmee de conserveermiddelen worden toegevoegd, worden
10 uitgedrukt in termen van de gewichtsverhouding van het conserveermiddel
ten opzichte van het gewicht van de levensvatbare cellen. Bijvoorbeeld
geeft een hoeveelheid van 10 aan dat conserveermiddel werd toegevoegd
met een hoeveelheid van 10 keer die van de levensvatbare cellen. De
levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans wordt uitgedrukt als een
15 percentage, waarbij 100% het levensvatbare celaantal onmiddellijk na
vriesdrogen is. De levensvatbaarheid tijdens vriesdrogen wordt aangeduid
als concentrische cirkels als de levensvatbaarheid meer dan 90% is, als
twee concentrische cirkels tot één cirkel als het percentage van 80 tot
90% is, als één cirkel als het percentage 60 tot 80% is, als een
20 vierkant als het percentage 40 tot 60% is, als een driehoek als het
percentage 20 tot 40% is en als een "x" als het percentage minder dan
20% is. Veranderingen in de titer van Lactobacillus clearans tijdens
opslag worden aangegeven als ++ als de titer werd gehandhaafd op een
hoog niveau, als + als de titer iets afnam, als ± als de titer duidelijk
25 afnam, als - als de titer aanzienlijk afnam en als - - als de titer snel
afnam.

(Tabel 12)

Veranderingen in levensvatbaarheid van *Lactobacillus clearans* met toepassing van eiwit-aminozuur-gebaseerde conserveermiddelen

Conserveermiddel		Resultaten tijdens vries-drogen	Veranderingen in tijd tijdens opslag			
Type	Toegevoegde hoeveelheid		Levensvatbaarheid (%)			Veranderingen in titer
			3 maanden	6 maanden	12 maanden	
Pepton	10	Δ	30	10	2	--
Casaminozuur	10	□	50	35	20	±
Cystine	20	o	70	50	35	+
Cysteïne	20	o	65	45	30	+
Methionine	20	o	65	45	30	+
Taurine	20	o	70	50	35	+
Alanine	20	Δ	30	15	5	-
Glycine	20	Δ	25	10	2	-
Natrium-glutamaat	20	□	60	40	20	±
Amino-boterzuur	20	□	65	45	25	±
Leucine	20	Δ	25	10	3	-
Lysine	20	Δ	30	15	5	±
Tryptofaan	20	Δ	25	10	4	-
Arginine	20	Δ	20	5	2	-
Asparagine	20	□	55	30	15	±
Ovalbumine	20	o	70	50	30	+
Sojawei	20	o	60	45	25	±
Eigeel	100	o	50	40	30	±
Gelatine	10	X	10	3	0	--

5

* uitgedrukt als gewichtsverhouding van conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen

10

1014166

(Tabel 13)

Veranderingen in levensvatbaarheid van *Lactobacillus clearans* met toepassing van sacchariden en dierlijk-eiwit-vitaminen-mineralen-complex-conserveermiddelen

5

Conserveermiddel		Resultaten tijdens vries-drogen	Veranderingen in tijd tijdens opslag			
Type	Toegevoegde hoeveelheid		Levensvatbaarheid (%)			Veranderingen in titer
			3 maanden	6 maanden	12 maanden	
Sacchariden						
Lactose	100	□	70	50	20	±
Oplosbaar zetmeel	100	□	60	40	15	±
Aardappel-zetmeel	100	Δ	30	20	10	-
Sucrose	20	Δ	30	15	5	-
Glucose	20	Δ	25	15	5	-
Trehalose	40	○	75	50	30	+
Eiwit-vitamine-mineralen-complexen						
Poeder-taptemelk	150	○	70	50	35	±
Leverextract	10	□	60	40	20	±
Gistextract	10	□	50	30	20	±
Hartextract	10	Δ	25	15	5	-
Paardeserum	250	□	60	40	25	±
Gist (gedode bakkersgist-cellen)	100	○	60	50	30	+

* uitgedrukt als gewichtsverhouding van conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen.

10

1014166

(Tabel 14)

Veranderingen in levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans met toepassing van plantaardig-eiwit-vitaminen-mineralen-complexen en andere

Conserveermiddel		Resultaten tijdens vries-drogen	Veranderingen in tijd tijdens opslag			
Type	Toegevoegde hoeveelheid		Levensvatbaarheid (%)			Veranderingen in titer
			3 maanden	6 maanden	12 maanden	
Eiwit-vitamine-mineraal-complexen (plant)						
Chlorella	50	0	65	45	35	+
Chlorella-CGF	20	□	60	40	30	±
Rijst-zemelen	20	0	60	50	35	+
Zemelen	20	0	55	45	33	+
Alfalfasap (gras)	40	□	50	35	25	±
Poedermiso	20	Δ	20	10	7	-
Azukipoeder	20	Δ	25	10	5	-
Sobanoedel-meel	20	X	20	5	1	--
Klaversap	250	□	60	45	25	±
Tarwekiem-extract	50	□	65	5	25	±
Sojamelk	100	0	70	55	35	+
Andere						
Tomatensap	50	□	50	35	20	±
Wortelsap	50	□	55	40	25	+
Sinaasappelsap	50	X	15	2	0,05	--
Grapefruit-sap	50	□	50	30	20	±
Aloëpoeder	10	Δ	35	20	10	±
Groene-thee-poeder	20	Δ	35	20	15	±
Fysiologische zoutoplossing	1,7	X	5	0	0	--

5

* uitgedrukt als gewichtsverhouding van conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen.

1014166

Uit Tabellen 12, 13 en 14 wordt duidelijk dat de toepassing van conserveermiddelen die hoge levensvatbaarheid verschaffen tijdens het vriesdrogen van Lactobacillus clearans, ook resulteerde in goede levensvatbaarheid tijdens opslag en dat tegelijkertijd geringere afnamen in de titer werden verkregen. Dat wil zeggen dat het door alleen bepalen van de levensvatbaarheid tijdens vriesdrogen mogelijk was om dramatische voortgang te maken bij navolgend onderzoek betreffende het snelle onderzoek van condities, van de keuze van de conserveermiddelen tot de temperatuur voorafgaand aan invriezen en van vriesdrogen, de droogtijd en dergelijke, zonder veel tijd in beslag te nemen. Als gevolg werd duidelijk dat algemeen toegepaste werkwijzen voor conventioneel bekende Lactobacillus geschikt waren voor condities als de temperatuur voorafgaand aan invriezen en de temperatuur van vriesdrogen en de droogtijd tijdens het bewerken van Lactobacillus clearans, maar de werkzaamheid van het conserveermiddel de belangrijkste factor was voor behouden van de levensvatbaarheid en titer.

Conserveermiddelen zonder conserverende uitwerkingen als deze op zichzelf werden toegepast, werden uitgesloten en de overgebleven conserveermiddelen werden in verscheidene combinaties onderzocht. Een aantal van de resultaten worden gegeven in Tabellen 15, 16 en 17. Hier worden de hoeveelheden waarmee de conserveermiddelen worden toegevoegd, uitgedrukt als de gewichtsverhouding van het conserveermiddel ten opzichte van het gewicht van levensvatbare cellen. Bijvoorbeeld duidt een hoeveelheid van 10 aan dat het conserveermiddel werd toegevoegd met een hoeveelheid die 10 keer dat van de levensvatbare cellen was. De levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans tijdens vriesdrogen wordt aangeduid als twee concentrische cirkels als de levensvatbaarheid meer dan 90% is, als twee concentrische cirkels naar één cirkel als het percentage 80 tot 90% is, als één cirkel als het percentage 60 tot 80% is, als een vierkantje als het percentage 40 tot 60% is, als een driehoekje als het percentage 20 tot 40% is en als een "x" als het percentage minder dan 20% is. Een vergelijking van Tabellen 13 en 14 onthult dat de conserveermiddelen betere levensvatbaarheid verschaffen als deze in combinatie werden toegepast dan wanneer deze afzonderlijk werden toegepast. De gecombineerde toepassing van dieren-afgeleide conserveermiddelen met planten-afgeleide types resulteerde natuurlijk in

goede levensvatbaarheid tijdens vriesdrogen, maar ook in betere uitwerkingen tijdens navolgende opslag. De resultaten worden gegeven in Tabel 18, waarbij de veranderingen in de titer van Lactobacillus clearans tijdens opslag worden aangeduid als ++ als de titer werd gehandhaafd op een hoog niveau, als + als de titer lichtelijk afnam, als ± als de titer duidelijk afnam, als - als de titer aanzienlijk afnam en als - - als de titer snel afnam.

(Tabel 15)

- 10 Veranderingen in de levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans met combinaties van twee types conserveermiddel

Type conserveermiddel	Toegevoegde hoeveelheid*	Resultaat tijdens vriesdrogen
Ovalbumine	10	O~①
Trehalose	20	
Ovalbumine	10	O
Taptemelk	100	
Ovalbumine	10	①
Sojamelk	70	
Ovalbumine	10	O~①
Wortelsap	35	
Trehalose	20	O~①
Taptemelk	100	
Trehalose	20	①
Sojamelk	70	
Trehalose	20	O
Wortelsap	35	
Taptemelk	75	①
Sojamelk	50	
Taptemelk	100	O~①
Wortelsap	35	
Sojamelk	70	O
Wortelsap	35	

- 15 * uitgedrukt als gewichtsverhouding conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen.

(Tabel 16)

Veranderingen in de levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans met combinaties van drie types conserveermiddel

Type conserveermiddel	Toegevoegde hoeveelheid*	Resultaat tijdens vriesdrogen
Ovalbumine	7	0
Trehalose	15	
Taptemelk	80	
Ovalbumine	7	0~①
Trehalose	15	
Sojamelk	65	
Ovalbumine	7	0~①
Trehalose	15	
Wortelsap	30	
Ovalbumine	7	①
Taptemelk	70	
Sojamelk	45	
Ovalbumine	7	0~①
Taptemelk	70	
Wortelsap	30	
Trehalose	15	①
Taptemelk	70	
Sojamelk	45	
Trehalose	15	0~①
Taptemelk	70	
Wortelsap	25	
Taptemelk	15	①
Sojamelk	45	
Wortelsap	25	

5

* uitgedrukt als gewichtsverhouding van conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen.

(Tabel 17)

Veranderingen in de levensvatbaarheid van Lactobacillus clearans met combinaties van vier tot vijf types conserveermiddel

5

Type conserveermiddel	Toegevoegde hoeveelheid*	Resultaat tijdens vriesdrogen
Ovalbumine	7	①
Trehalose	15	
Taptemelk	70	
Sojamelk	45	
Ovalbumine	7	0~①
Trehalose	15	
Taptemelk	70	
Wortelsap	25	
Ovalbumine	7	①
Trehalose	15	
Sojamelk	45	
Wortelsap	25	
Trehalose	15	①
Taptemelk	70	
Sojamelk	45	
Wortelsap	25	
Ovalbumine	7	①
Trehalose	15	
Taptemelk	70	
Sojamelk	45	
Wortelsap	25	

* uitgedrukt als gewichtsverhouding van conserveermiddel ten opzichte van gewicht van levensvatbare cellen.

1014166

(Tabel 18)

Veranderingen in de levensvatbaarheid en titer van Lactobacillus clearans met toepassing van conserveermiddelen die meer dan 90% levensvatbaarheid verschaffen tijdens vriesdrogen

	Over tijd gemiddelde levensvatbaarheid			Veranderingen in titer
	3 maanden	6 maanden	12 maanden	
Als conserveermiddelen worden toegepast die tijdens vriesdrogen 90% levensvatbaarheid verschaffen	95%	80%	70%	++

5

Het was duidelijk dat uitstekende conserveringseffecten werden verkregen met de gezamenlijke toepassing van materialen waaraan lactobacilli hechten en waarop ze in symbiotisch verband leven in de natuur, zoals rijsteszemelen, zemelen, gist, chlorella, grassen, zoals klaver en vruchten, zoals druiven, samen met de materialen die met een enkelvoudige cirkel of enkelvoudig vierkantje worden gewaardeerd in Tabellen 12, 13 en 14, zoals sojamelk.

15 Tevens werd bevestigd dat de conserveerbaarheid verder kon worden verbeterd als materialen die effectief de titer onderhouden, zoals geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen, aminozuren, zoals zwavel-bevattende aminozuren en glutaminezuur, vitaminen, zoals vitamine C, en calciumpantothenaat, mineralen, zoals zink en magnesium, 20 en galpoeder werden toegevoegd, ofwel op zichzelf ofwel in combinatie, met hoog werkzame conserveermiddelen tijdens de subculture van Lactobacillus clearans.

Verscheidene vormen van conservering werden beschouwd in toevoeging aan vriesdrogen als werkwijzen voor conserveren van 25 Lactobacillus clearans, zoals natte conservering van vloeistoffen of celmassa, halfdroge conservering met ongeveer 15% vochtgehalte, droge conservering met een vochtgehalte van ongeveer 8% en ultrakoude conservering bij -40 tot -196°C, maar werden in de grond van de zaak goede resultaten verkregen als deze werden geconserveerd met 30 conserveermiddelen die de hierboven beschreven uitstekende effecten lieten zien tijdens toepassing bij vriesdrogen.

1014166

De onderhavige uitvinding wordt hieronder met verwijzing naar voorbeelden in detail beschreven, maar de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding wordt niet beperkt tot alleen deze voorbeelden.

5 (Voorbeeld 1)

10 L medium (pH 7,0) dat 5 g vleesextract (Wako Pure Chemical Industries LTD.), 5 g pepton (Wako Pure Chemical Industries LTD.), 3 g natriumbutyrat (Wako Pure Chemical Industries LTD.), 1 ml waterige ammoniak (Wako Pure Chemical Industries LTD.), 10 g glucose (Wako Pure Chemical Industries LTD.), 0,5 g cystine (Wako Pure Chemical Industries LTD.) en 2 g gistextract (Nihon Seiyaku) per liter medium omvatte, werd geïncubeerd met Lactobacillus clearans (FERM P-17150, BP-6973) voor 72 uur anaërobe kweek bij 37°C. De kweekbouillon werd gecentrifugeerd, wat 10 g van een celmassa gaf. De massa werd gewassen met 500 ml fysiologische zoutoplossing (bereid uit natriumchloride van Wako Pure Chemical Industries LTD.) en twee keer gecentrifugeerd. De resulterende gezuiverde celmassa werd geïntroduceerd bij een oplossing die bestond uit 500 ml sojamelk (van Tsujimoto Shokuhin Kogyo), 50 g taptemelk (Snow Brand Milk Products Co.), 30 g trehalose (Hayashibara KK) en 0,5 g cystine (Wako Pure Chemical Industries LTD) en goed geroerd. Het mengsel werd gevriesdroogd bij vacuüm d.m.v. een gewone werkwijze, wat 133 g bacteriecelpreparaat gaf. Het cel aantal was $3,0 \times 10^9$ cellen/g. Het celpreparaat werd opgeslagen bij kamertemperatuur met een silicagel-dessicans [droogmiddel] (Manabe Kaseihin) en een zuurstof-absorbans (Mitsubishi Gas Chemical Co.), het levensvatbare-celaantal werd over 18 maanden onderzocht om de levensvatbaarheid te berekenen en de titer werd getest, met de in Tabel 19 gegeven resultaten. Tabel 19 laat zien dat een hoge Lactobacillus-clearans-titer werd gehandhaafd, nagenoeg zonder neergang.

(Tabel 19)

Voorbeelden van veranderingen in levensvatbare-cellenaantal van Lactobacillus clearans, levensvatbaarheid en titer

Aantal levensvatbare cellen/g					Veranderingen in titer
Onmiddellijk na bereiding	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden	
$3,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	++
Levensvatbaarheid		83	66	50	

5

(Voorbeeld 2)

10 L medium (pH 7,0) dat 30 g sojawei (Fuji Oil Co.), 1 g pepton (Wako Pure Chemical Industries LTD), 1 g cystine (Wako Pure Chemical Industries LTD), 3 g natriumacetaat (Wako Pure Chemical Industries LTD), 0,2 g natriumsulfide (Wako Pure Chemical Industries LTD), 0,01 g calciumpantothenaat (Wako Pure Chemical Industries LTD) en 2 g bakkersgist (Oriental Yeast) per liter medium omvatte, werd geïnoculeerd met Lactobacillus clearans (FERM P-17149, BP-6971) voor 72 uur anaëroobe kweek bij 37°C. De kweekbouillon werd gecentrifugeerd, wat 28 g gaf van een celmassa die bestond uit Lactobacillus clearans en dode gistcellen. De massa werd gewassen met 500 ml fysiologische zoutoplossing (bereid met natriumchloride afkomstig van Wako Pure Chemical Industries LTD) en twee keer gecentrifugeerd. De resulterende gezuiverde celmassa werd geïntroduceerd bij 500 ml water dat 10 g gedroogde chlorella (Yamai), 25 g trehalose (Hayashibara KK) en 5 g oplosbaar zetmeel (Wako Pure Chemical Industries LTD) bevatte, en goed geroerd. Het mengsel werd daarna bij vacuüm gevriesdroogd d.m.v. een gewone werkwijze, wat 43 g bacteriecelpreparaat gaf. Het celaantal was $10,0 \times 10^9$ cellen/g. Het celpreparaat werd opgeslagen bij kamertemperatuur in glazen potten die werden afgeschermd van licht, samen met silicageldessicans (Manabe Kaseihin) en een zuurstofabsorbens (Mitsubishi Gas Chemical Co.), het levensvatbare-cellenaantal werd over 18 maanden onderzocht om de levensvatbaarheid te berekenen en de titer werd getest, met de in Tabel 20

gegeven resultaten. Tabel 20 laat zien dat een hoge Lactobacillus-clearans-titer werd behouden, met nagenoeg geen afname.

(Tabel 20

- 5 Voorbeelden van veranderingen in levensvatbare-cellenaantal van Lactobacillus clearans, levensvatbaarheid en titer

Aantal levensvatbare cellen/g					Veranderingen in titer
Onmiddellijk na bereiding	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden	
10,0x10 ⁹	9,5x10 ⁹	8,5x10 ⁹	7,0x10 ⁹	5,0x10 ⁹	++
Levensvatbaarheid		85	70	50	

- 10 (Vergelijkingsvoorbeeld 1)

10 L medium (pH 7,0) dat 10 g vleesextract (Wako Pure Chemical Industries LTD), 10 g pepton (Wako Pure Chemical Industries LTD), 3 g gistextract (Nihon Seiyaku), 10 g glucose (Wako Pure Chemical Industries LTD), 2 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 1 g NaCl en 1 g CaCl₂·2H₂O per liter

15 medium omvatte, werd geïnoculeerd met Lactobacillus clearans (FERM PM17150, BP-6973) voor 72 uur anaërobe kweek bij 37°C. De kweekbouillon werd gecentrifugeerd, wat 18 g van een celmassa gaf. De massa werd gewassen met 500 ml fysiologische zoutoplossing (bereid met natriumchloride afkomstig van Wako Pure Chemical Industries LTD) en twee

20 keer gecentrifugeerd. De resulterende gezuiverde celmassa werd geïntroduceerd bij 1000 ml 20%-oplossing oplosbaar zetmeel (Wako Pure Chemical Industries LTD) en goed geroerd. Het mengsel werd gevriesdroogd bij vacuüm d.m.v. een gewone werkwijze, wat 204 g bacteriecelpreparaat gaf. Het celaantal was 4,5 x 10⁹ cellen/g. Het

25 celpreparaat werd opgeslagen bij kamertemperatuur met een silicagel-dessicans (Manabe Kaseihin) en een zuurstofadsorbens (Mitsubishi Gas Chemical Co.), het levensvatbare-celaantal werd over 18 maande onderzocht om de levensvatbaarheid te berekenen en de titer werd getest, met de in Tabel 21 gegeven resultaten. Tabel 21 laat zien dat niet

30 alleen de levensvatbaarheid snel afnam, maar ook dat de titer

aanzienlijk afnam als Lactobacillus clearans werd gekweekt in een gewoon medium en werd geconserveerd d.m.v. een gewone werkwijze.

(Tabel 21)

- 5 Voorbeeld van veranderingen in levensvatbare-celaantal, levensvatbaarheid en titer van Lactobacillus clearans in gewoon medium en met gewone conservering

Aantal levensvatbare cellen/g					Veranderingen in titer
Onmiddellijk na bereiding	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden	
$4,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	0	---
Levensvatbaarheid	55	33	9	0	

10

(Vergelijkingsvoorbeeld 2)

- 10 L medium (pH 7,0) dat 10 g vleesextract (Wako Pure Chemical Industries LTD), 10 g pepton (Wako Pure Chemical Industries LTD), 3 g gistextract (Nihon Seiyaku), 10 g glucose (Wako Pure Chemical Industries LTD), 2 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl en 1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ per liter medium omvatte, werd geïnoculeerd met Lactobacillus clearans (FERM P-17150, BP-6973) voor 72 uur anaërobe kweek bij 37°C. De kweekbouillon
- 20 werd gecentrifugeerd, wat 18 g van een celmassa gaf. De massa werd gewassen met 500 ml fysiologische zoutoplossing (bereid met natriumchloride afkomstig van Wako Pure Chemical Industries LTD) en twee gecentrifugeerd. De resulterende gezuiverde celmassa werd geïntroduceerd bij een oplossing die bestond uit 900 ml sojamelk (van Tsujimoto
- 25 Shokuhin Kogyo), 90 g taptemelk (Snow Brand Milk Products Co.), 54 g trehalose (Hayashibara KK) en 0,9 g cystine (neutrale) (Wako Pure Chemical Industries LTD) en goed geroerd. Het mengsel werd gevriesdroogd bij vacuüm d.m.v. een gewone werkwijze, wat 239 g bacteriecelpreparaat gaf. Het celaantal was $5,0 \times 10^9$ cellen/g. Het celpreparaat werd
- 30 opgeslagen bij kamertemperatuur met een silicageldessicans (Manabe

1014166

Kaseihin) en een zuurstofabsorbens (Mitsubishi Gas Chemical Co.), het levensvatbarecel aantal werd over 18 maanden onderzocht om de levensvatbaarheid te berekenen en de titer werd getest, met de in Tabel 22 gegeven resultaten. Tabel 22 laat zien dat goede levensvatbaarheid werd verkregen, hoewel niet zo goed als bij Voorbeeld 1, als Lactobacillus clearans werd gekweekt d.m.v. een gewone werkwijze en werd geconserveerd d.m.v. een de werkwijze van de onderhavige uitvinding. De titer nam echter enigszins af tijdens kweek en had de neiging daarna verder te gaan met afnemen, al was dat geleidelijk.

10

(Tabel 22)

Voorbeelden van veranderingen in levensvatbare-celaantal, levensvatbaarheid en titer van Lactobacillus clearans in gewoon medium, maar met conservering d.m.v. de onderhavige uitvinding

15

Aantal levensvatbare cellen/g					Veranderingen in titer
Onmiddellijk na bereiding	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden	
$5,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	±
Levensvatbaarheid	90	76	50	40	

(Vergelijkingsvoorbeeld 3)

20 10 L medium (pH 7,0) dat 5 g vleesextract (Wako Pure Chemical Industries LTD), 5 g pepton (Wako Pure Chemical Industries LTD), 3 g natriumbutyrat (Wako Pure Chemical Industries LTD), 1 g waterige ammoniak (Wako Pure Chemical Industries LTD), 10 g glucose (Wako Pure Chemical Industries LTD), 0,5 g cystine (Wako Pure Chemical Industries LTD) en 2 g gistextract (Nihon Seiyaku) per liter medium omvatte, werd geïnculeerd met Lactobacillus clearans (FERM P-17150, BP-6973) voor 72 uur anaërobe kweek bij 37°C. De kweekbouillon werd gecentrifugeerd, wat 10 g van een celmassa gaf. De massa werd vervolgens gewassen met 500 ml fysiologische zoutoplossing (bereid met natriumchloride afkomstig van Wako Pure Chemical Industries LTD) en twee keer gewassen. De

25

30

resulterende gezuiverde celmassa werd geïntroduceerd bij 550 ml een 20%-oplossing van oplosbaar zetmeel (Wako Pure Chemical Industries LTD) en goed geroerd. Het mengsel werd gevriesdroogd bij vacuüm d.m.v. een gewone werkwijze, wat 112 g bacteriecelpreparaat gaf. Het cel aantal was
 5 $2,5 \times 10^9$ cellen/g. Het celpreparaat werd bij kamertemperatuur opgeslagen met een silicageldessicans (Manabe Kaseihin) en een zuurstofabsorbans (Mitsubishi Gas Chemical Co.), het levensvatbare-cellenaantal werd over 18 maanden onderzocht om de levensvatbaarheid te berekenen en de titer werd getest, met de in Tabel 23 gegeven
 10 resultaten. Tabel 23 laat zien dat de levensvatbaarheid neigde hetzelfde te zijn als die bij Vergelijkingsvoorbeeld 1 als Lactobacillus clearans werd gekweekt in het medium van de onderhavige uitvinding en werd geconserveerd d.m.v. een gewone werkwijze. De titer daalde niet zo snel als die dat deed bij Vergelijkingsvoorbeeld 1, maar had de neiging
 15 geleidelijk af te nemen.

(Tabel 23)

Voorbeeld van veranderingen bij levensvatbare-cellenaantal, levensvatbaarheid en titer van Lactobacillus clearans in medium van de
 20 onderhavige uitvinding, maar d.m.v. gewone conservering

Aantal levensvatbare cellen/g					Veranderingen in titer
Onmiddellijk na bereiding	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden	
$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	-
Levensvatbaarheid	60	40	15	0,4	

Lactobacillus clearans bestaat uit nieuwe stammen van
 25 lactobacilli die geurende zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen utiliseren en zijn opgemerkt als effectieve stammen die een krachtig zuiverend vermogen laten zien in de darmen vanwege de bovenstaande functies. Er zijn echter geen bekende werkwijzen als deze voor verkrijgen van lactobacilli met een hoge titer die dergelijke functies
 30 vertonen, of werkwijzen voor laten aanhouden van de hoge titer die wordt verkregen, gedurende lange tijdsduren.

De toepassing van het kweekmedium bij de onderhavige uitvinding maakt mogelijk dat Lactobacillus clearans met een hoge titer wordt gekweekt op een stabiele wijze zodat geurende schadelijke zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen zonder meer kunnen worden afgebroken en geëlimineerd. Dienovereenkomstig worden niet alleen enterale geurende schadelijke materialen verlaagd, maar kunnen bacteriën die als zijnde nuttig voor de darmflora worden beschouwd, dramatisch worden verhoogd, terwijl de groei van schadelijke bacteriën sterk kan worden onderdrukt.

De toepassing van de werkwijze van conserveren bij de onderhavige uitvinding maakt mogelijk dat Lactobacillus clearans met een hoge titer gedurende lage tijdsduren kan worden geconserveerd zodat geurende schadelijke zwavel-, stikstof- en koolstofverbindingen zonder meer kunnen worden afgebroken en geëlimineerd als dat nodig is.

Conclusies

1. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de
toevoeging omvat van ten minste één van of beide van
5 natriumsulfide en waterige ammoniak, zodat tijdens de kweek van de
Lactobacillus clearans ten minste één van of beide van
natriumsulfide en ammoniak wordt vermindert door Lactobacillus
clearans ten tijde van het 24^e uur van kweek.
2. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de
10 toevoeging omvat van ten minste één van of meer van geurende
zwavelverbindingen, geurende stikstofverbindingen en geurende
koolstofverbindingen, aan het kweekmedium, op de in Conclusie 1
naar voren gebrachte wijze.
3. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, waarbij de
15 geurende zwavelverbinding zoals die in Conclusie 2 naar voren
wordt gebracht, ten minste één of meer is van natriumsulfide,
waterstofsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercap-
tan, dimethylmercaptan, dimethylsulfide, dimethyldisulfide,
diëthylsulfide, dibutylsulfide en derivaten daarvan.
- 20 4. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, waarbij de
geurende stikstofverbinding zoals die in Conclusie 2 naar voren
wordt gebracht, ten minste één of meer is van ammoniak, skatol,
indol, acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine,
triëthylamine of derivaten daarvan.
- 25 5. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, waarbij de
geurende koolstofverbinding zoals die in Conclusie 2 naar voren
wordt gebracht, ten minste één of meer is van mierzuur,
azijnzuur, propionzuur, boterzuur, formaldehyde, acetaldehyde,
propionaldehyde, crotonaldehyde, fenol, butylalcohol, amylalcohol
30 en derivaten daarvan.
6. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de
toevoeging omvat van ten minste één van of meer van zwavel-

bevattend aminozuur, glutaminezuur, lysine en asparaginezuur, als een aminozuur, aan een kweekmedium, zoals naar voren wordt gebracht in één van Conclusies 1 tot en met 5.

- 5 7. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van vitamine C, vitamine E, vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur en nicotinamide, als een vitamine, aan een kweekmedium, zoals naar voren wordt gebracht in één van Conclusies 1 tot en met 6.
- 10 8. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van mangaan, zink, magnesium en molybdeem, als een mineraalbestanddeel, aan een kweekmedium, zoals naar voren gebracht in één van conclusies 1 tot en met 7.
- 15 9. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van chlorella-CGF, sojamelk en galpoeder aan een kweekmedium zoals in één van conclusies 1 tot en met 8 naar voren wordt gebracht.
- 20 10. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welk de toevoeging omvat van natriumsulfide met een concentratie van 500 p.p.m. aan een kweekmedium zoals in één van conclusies 1 tot en met 9 naar voren wordt gebracht, waarbij de natriumsulfide met 10% of meer wordt verlaagd ten tijde van het 24^e uur van kweek tijdens de kweek van Lactobacillus clearans.
- 25 11. Kweekmedium voor kweken van Lactobacillus clearans, welke de toevoeging omvat van waterige ammoniak met een concentratie van 500 p.p.m. aan een kweekmedium zoals naar voren wordt gebracht in één van conclusies 1 tot en met 9, waarbij de ammoniak met 10% of meer wordt verlaagd ten tijde van het 24^e uur van kweek tijdens de kweek van Lactobacillus clearans.
- 30 12. Werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans, welke de aanwezigheid omvat van ten minste één van of meer van zwavel-bevattend aminozuur, ovalbumine, galpoeder, trehalose, raffinose, dode gistcellen, chlorella, rijstezemelen, zemelen, sojamelk en

wortelsap, als een conserveermiddel rondom de Lactobacillus clearans tijdens de conservering van Lactobacillus clearans.

13. Werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans, welke in toevoeging aan een conserveermiddel zoals in Conclusie 12 naar voren wordt gebracht, de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van glutaminezuur, lysine, asparaginezuur, vitamine C, vitamine E, vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur, nicotinamide, mangaan, zink, magnesium, molybdeem, natriumsulfide, waterstofsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylmercaptan, dimethylsulfide, dimethyldisulfide, diëthylsulfide, dibutylsulfide, ammoniak, skatol, indol, acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine, triëthylamine, mierzuur, azijnzuur, propionzuur, boterzuur, formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, fenol, butylalcohol, amylalcohol en derivaten daarvan, rondom de Lactobacillus clearans.

14. Werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans, welke de aanwezigheid omvat van ten minste één van of meer van van dieren afgeleide poedertaptmelk, ovalbumine, lactose, leverextractpoeder en serum, alsmede ten minste één van of meer van van planten afgeleide sojawei, trehalose, raffinose, zetmeel, chlorella, chlorella-CGF, rijstezemelen, zemelen, alfalfasap, klaversap, tarwekiemextract, sojamelk, tomatensap, wortelsap, druivensap, aloëpoeder, groene-thee-poeder, gistextractpoeder en dode gistcellen, als een conserveringsmiddel rondom de Lactobacillus clearans tijdens de conservering van Lactobacillus clearans.

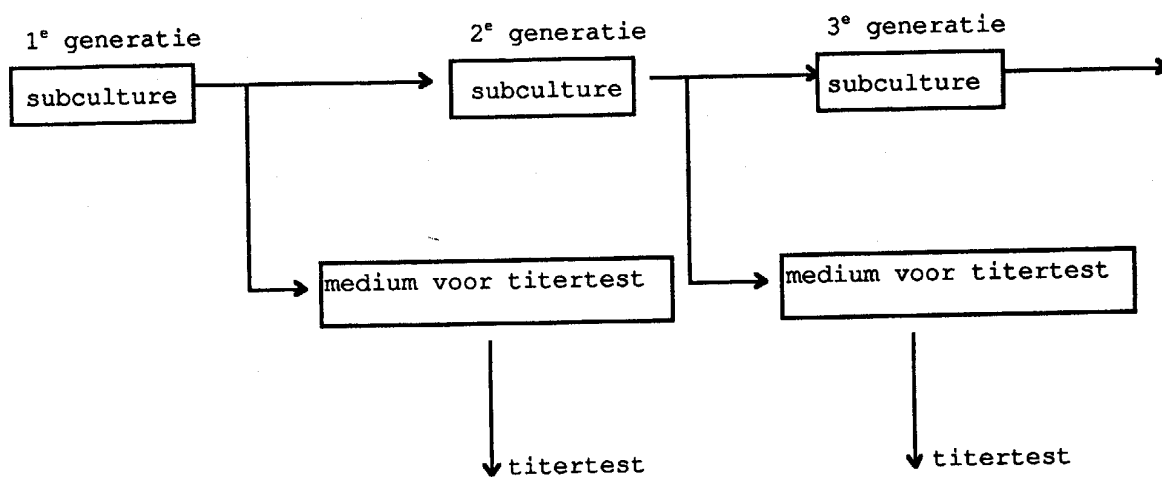
15. Werkwijze voor conserveren van Lactobacillus clearans, welke in toevoeging aan een conserveringsmiddel zoals in Conclusie 14 naar voren wordt gebracht, de toevoeging omvat van ten minste één van of meer van glutaminezuur, lysine, asparaginezuur, vitamine C, vitamine E, vitamine B₁₂, calciumpantothenaat, foliumzuur, nicotinamide, mangaan, zink, magnesium, molybdeem, natriumsulfide, waterstofsulfide, ammoniumsulfide, methylmercaptan, ethylmercaptan, dimethylmercaptan, dimethylsulfide, dimethyldisulfide, diëthylsulfide, dibutylsulfide, ammoniak, skatol, indol,

acetanilide, methylamine, dimethylamine, diëthylamine,
triëthylamine, mierzuur, azijnzuur, propionzuur, boterzuur,
formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde,
fenol, butylalcohol,, amylalcohol en derivaten daarvan, rondom de
5 Lactobacillus clearans.

16. Conserveringswerkwijze voor conserveren van Lactobacillus
clearans, zoals in één van Conclusies 12 tot en met 15 naar voren
wordt gebracht, waarbij de conserveringswerkwijze één van
vriesdrogen, ultrakoude conservering of vloeibare, natte,
10 halfdroge of droge werkwijzen omvat.

Fig. 1

Correlatie tussen kweek en titertest tijdens subculture van Lactobacillus clearans





RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octroolaanvraag Nr.:

NO 134565
NL 1014166

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
	EENHEID VAN UITVINDING ONTBREEKT zie aanvullingsblad B ---		C12N1/04 C12N1/20
X	GB 1 584 694 A (SEIKEN KAI FOUNDATIONAL JURIDI) 18 Februari 1981 (1981-02-18) * bladzijde 1, regel 16 - regel 22 * * bladzijde 2 * * bladzijde 6, regel 4 - regel 16; tabel 6 *	1-11	
X	EP 0 208 818 A (SEIKENKAI) 21 Januari 1987 (1987-01-21) * kolom 16; voorbeeld 1; tabel 2 * * kolom 4, regel 28 - kolom 6, regel 4 * * kolom 9, regel 12 - regel 23 * * kolom 5, regel 15 - regel 25 * * bladzijde 11; tabel 2 * * kolom 7-8, regel 30 *	1-7	
X	US 4 579 734 A (MARUOKA TOSHIYUKI ET AL) 1 April 1986 (1986-04-01) * samenvatting * * kolom 17 * * kolom 3, regel 1 - regel 24 * * kolom 6; tabel 2 * * conclusies *	1-5,7,8	Onderzochte gebieden van de techniek
A	US 4 888 292 A (HATA KOSEI) 19 December 1989 (1989-12-19) * het gehele document *	1-11	C12N A61K
		-/--	
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek 'S-GRAVENHAGE		Datum waarop het onderzoek werd voltooid 23 Juli 2003	Vooronderzoeker (EOB) Le Cornec, N
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octrooifamilie, corresponderende literatuur document			

3

EOB FORM 02.83 (P0414)



RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octroolaanvraag Nr.:

NO 134565

NL 1014166

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 86, no. 25, 1977 Columbus, Ohio, US; abstract no. 187707b, HATA KOSEI ET AL: "cultivation of excrement deodorizing Lactobacillus" bladzijde 435; kolom r; XP008019945 * samenvatting * & JP 52 018879 A (SEIKENKAI) 12 Februari 1977 (1977-02-12) -----	1-5	
			Onderzochte gebieden van de techniek
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek		Datum waarop het onderzoek werd voltooid	Vooronderzoeker (EOB)
'S-GRAVENHAGE		23 Juli 2003	Le Cornec, N
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooi-publicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octrooifamilie, corresponderende literatuur document			

3

EOB FORM 02 B3 (P0414)

GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING

Octrooiaanvraag Nr.:

NO 134565

NL 1014166

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

1. conclusies: 1-11

Kweekmedium voor kweken van *Lactobacillus clearans*.

2. conclusies: 12-16

Werkwijze voor conserveren van *Lactobacillus clearans*.

Het vooronderzoek werd tot het eerste onderwerp beperkt.

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE OCTROOIAANVRAGE NR.**

NO 134565
NL 1014166

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

23-07-2003

In het rapport genoemd octrooigeschrift		Datum van publicatie		Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
GB 1584694	A	18-02-1981	JP	52154590 A	22-12-1977
			BR	7703307 A	31-01-1978
			CA	1093996 A1	20-01-1981
			DE	2723191 A1	08-12-1977
			FR	2352057 A1	16-12-1977
EP 0208818	A	21-01-1987	JP	1740493 C	15-03-1993
			JP	4029348 B	18-05-1992
			JP	60149527 A	07-08-1985
			AU	4503485 A	22-01-1987
			EP	0208818 A1	21-01-1987
			IN	162045 A1	19-03-1988
			US	4871539 A	03-10-1989
US 4579734	A	01-04-1986	JP	1714431 C	27-11-1992
			JP	4000632 B	08-01-1992
			JP	59011177 A	20-01-1984
			AU	556996 B2	27-11-1986
			AU	1676583 A	19-01-1984
			BR	8303725 A	14-02-1984
			CA	1204686 A1	20-05-1986
			DE	3381903 D1	31-10-1990
			EP	0099235 A2	25-01-1984
			KR	9103307 B1	27-05-1991
			PH	19244 A	14-02-1986
US 4888292	A	19-12-1989	US	4879238 A	07-11-1989
JP 52018879	A	12-02-1977	GEEN		