



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 322150

(13) B1

(51) Int Cl.

A23L 1/0522 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20013388	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.01.14 PCT/AU00/00021
(22)	Inng.dag	2001.07.09	(85)	Videreføringsdag	2001.07.09
(24)	Løpedag	2000.01.14	(30)	Prioritet	1999.01.14, AU, 8168/99
(41)	Alm.tilgj	2001.08.21			
(45)	Meddelt	2006.08.21			
(73)	Innehaver	Food Technology Innovations Pty Ltd , ACN 081 936 861, of G13 Biological Sciences Building, Univ. of New South Wales, NSW 2052, AU			
(72)	Oppfinner	Patricia Lynne Conway, NSW, AU Ian Lewis Brown, 18 Valley Way, Gympie, NSW 2227, AU Xin Wang, Chapel Hill, Qld, AU Rachel Jane Lucas, Maroubra, NSW, AU			
(74)	Fullmektig	Curo AS , Postboks 38, 7231 LUNDAMO, NO			

(54) Benevnelse **Forbedret mikrobiell utforming og produkt inneholdende utformingen, samt fremgangsmåte for fremstilling av utformingen.**

(56) Anførte publikasjoner Food Australia, 50 (12), 1998, s. 603-610, Brown et al
WO-A1-9734592

(57) Sammendrag
Mikrobielle utforminger med et økt vekst/ utbytte potensial, eller økt overlevelses/resitusjons rate i et produkt, framstillingen omfatter mikrober dyrket eller kultivert i et medium basert på eller inneholdende resistent stivelse, framgangsmåter for framstilling av de mikrobielle utformingene og produkter inneholdende de mikrobielle utformingene.

Foreliggende oppfinnelse angår hovedsakelig mikrobielle utforminger inneholdende mikrober som har økt vekst/utbytte potensial, eller økt overlevelses/restitusjons rate ved bruk. De mikrobielle utformingene er særlig egnet for inneslutning i prebiotiske og probiotiske utforminger og produkter inkludert matvarer, fôr, nutrasøytiske og farmasøytiske produkter som inneholder probiotiske mikroorganismer, og produkter fermentert ved tilsats av mikroorganismer.

Bakgrunn

Probiotiske produkter, for eksempel løsninger, pulver, tabletter og kapsler blir administrert oralt for å bedre helsen. Lignende matvarer blir konsumert, ikke bare som føde, men også for å bedre helsen, så som gjennom tilsats av probiotiske mikroorganismer. Dyrefôr blir også framstilt med tilsatte probiotiske mikroorganismer for å fremme veksten og ytelsen hos dyrene. Nylige trender med konsum av probiotiske blandinger for helse fordeler har ført til bruk av probiotiske mikroorganismer i en mengde utforminger, samt inneslutning i en lang rekke foredlete matvarer og fôrprodukter, inkludert foredlete melkebaserte produkter. Mikroorganismer er også satt til som startkulturer for å framstille en rekke fermenterte matvarer, for eksempel melk, kjøtt og vegetabiliske produkter.

Slik som det blir benyttet i foreliggende beskrivelse, er en probiotisk eller probiotisk mikroorganisme et levende mikrobielt mat-tilsetningsmiddel som fordelaktig påvirker vertsdyret ved å bedre dets mikrobielle tarm-balanse. Denne definisjonen er framskaffet av R.Fuller (AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, UK) i Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66, pp 365-378 "Probiotics in Man and Animals - A Review", og har deretter blitt utvidet til å omfatte supplement og mat for mennesker. En probiotisk eller probiotisk mikroorganisme inkluderer også et levende mikrobielt tilsetningsmiddel eller farmasøytisk utforming som kan administreres til den nasale hulen eller det vaginale området som med fordel påvirker verts-dyret ved å bedre dets mikrobielle balanse ved det respektive administrasjons-setet.

Sammensetningen og mengden av mikrofloraen i magen kan påvirkes av forhold og stress forårsaket av sykdom, livsstil, reiser og andre faktorer. Dersom mikroorganismene som positivt påvirker helsen og velværet hos individet kan oppmuntres til å mangfoldiggjøres i tykktarmen, kan dette bedre det fysiologiske velværet hos verten.

Innføringen av fordelaktige mikroorganismer, eller probiotisk, blir vanligvis utført ved å innføre mikroorganismene i matvarer, drinker, fermenterte meieriprodukter, så som

yoghurt, kapsler, sukkertøy og andre former, på en slik måte at organismen ankommer tykktarmen eller et annet aktuelt sted i verten, levende.

Et problem med inneslutningen av probiotiske mikroorganismer i foredlete matprodukter er at mikroorganismene ofte ikke kan overleve i matproduktene over lengre tid. Under
 5 produksjon og lagring av matproduktene, er det ofte en betydelig nedgang i antall levedyktige mikroorganismer. For eksempel er vanlig holdbarhetstid av melkebaserte produkter beregnet til tidsperioden før produktet blir ødelagt. Når probiotiske mikroorganismer blir satt til disse produktene, kan ikke holdbarhetstiden for produktet være gjeldende med hensyn på administrering av det ønskete antallet mikroorganismer til magen for å oppnå den
 10 ønskete fordelaktige effekt.

Andre anvendelser av mikrober inkluderer biokontroll og bioforebyggere. Mikrobielle utforminger som inkluderer mikrober egnet for disse anvendelsene og som har økt vekst/utbytte potensial, eller økt overlevelse/restitusjons rate, vil være fordelaktige. For eksempel betyr det at enkelte bifidobakterier og acidofilus stammer er aktive mot *Escherichia coli* og
 15 *Samonella spp*, at bakterien har anvendelse som en biokontrollerende forbindelse. Andre mikrober har også biokontrollerende anvendelser, for eksempel forskjellige sopper og *Bacillus* stammer. Dessuten er Psudomonader kjent for å være en effektiv bioforebygger og den foreliggende oppfinnelsen er anvendbar for å fremme deres levedyktighet. En annen vanlig benyttet bioforebyggende mikrobe er *Alcaligenes*.

Oppfinnerene av foreliggende oppfinnelse gjorde den overraskende oppdagelsen at inneslutningen av stivelse, maltose eller resistent stivelse, særlig resistent stivelse i form av, eller utledet fra, stivelse i kostfiber, i vekstmediet for mikroorganismene kan øke veksten og utbytte av mikroorganismene, samt øke antall overlevende av mikroorganismene i mikrobielle utforminger eller startkulturer og i mat og for produkter under produksjon og
 25 over holdbarhetstiden for disse produktene, samt bedre overlevelseshraten av mikrober under transporten gjennom fordøyelses-systemet.

Fra Food Australia, 50 (12), 1998, s. 603-610, Brown et al, er det kjent å anvende resistent stivelse i et fermenteringssubstrat for probiotiske bakterier for å øke veksten av bakterier. Det er også kjent at resistent stivelse kan øke overlevelsen av bifidobakterier
 30 under sure forhold som finnes i magen. Fra WO-A1-9734592 er det kjent at resistent stivelse kan øke veksten av Bacterioider.

Kostfiber er definert som målt av AOAC, International (Association of the Official Analytical Chemistry) Total dietary fiber in foods: enzyme-gravimetric method (metode

985.29). Assoc. Off. Anal. Chemists, Official Methods of Analyses, 16. utg., Arlington VA, USA, 1995. Ytterligere tilsats av resistant stivelse til de mikrobielle utformingene etter vekst av mikrobene kan også ytterligere fremme hardførheten av mikrobene, og fører dermed til bedret overlevelse av mikroorganismene. Oppdagelsen er også anvendbar for

5 biokontrollerende og bioforebyggende utforminger, samt mat som fermenteres ved tilsats av mikroorganismer, startkulturer, ettersom mer robuste startkulturer også kan framstilles ved vekst på resistente stivelses-medium og/eller tilsats av resistant stivelse til etter-følgende produkt, som beskrevet ovenfor.

10 Oppfinnelsen

I et første generelt aspekt framskaffer foreliggende oppfinnelse en bedret mikrobiell utforming inkludert mikrober som har en økt overlevelses/restitusjons rate i et produkt eller fermentering. Produktet er fortrinnsvis mat, fôr, nutrasøytisk, farmasøytisk, bio-

15 kontrollerende eller bioforebyggende produkt. Den mikrobielle utformingen omfatter fortrinnsvis mikrober som tidligere ble dyrket i et medium basert på, eller inneholdende, resistant stivelse slik at de høstete mikrobene har en økt levedyktighet/restitusjons rate ved den etterfølgende bruk. En form av resistant stivelse som er særlig egnet for den fore-

liggende oppfinnelsen, er stivelse omfattende resistant stivelse, særlig høy-amylose mais-stivelse eller materialer utledet var høy-amylose mais-stivelse. I den etterfølgende bruken,

20 kan utformingen blandes med ytterligere stivelse for ytterligere å fremme vekst/utbytte potensialet, eller økt levedyktighet/restitusjons rate av mikrobene i produktet. Det er funnet at vekst i media basert på, eller inneholdende, løselig stivelse, maltose eller resistant stivelse, ser ut til å fremme mikrobenes egenskap til å binde til ytterligere resistant stivelse som blir satt til produktet, og fremmer dermed vekst/utbytte potensialet, eller øker leve-

25 dyktighet/ restitusjons raten av mikrobene.

Mikrobene i de bedrete mikrobielle utformingene i samsvar med det første aspektet av oppfinnelsen er særlig upåvirket av stress, inkludert ventilasjon, skjær, frysetørring, frysing, tørring inkludert høy, medium og lav vann-aktivitet, høye temperaturer, lave temperaturer, trykk og trykk svingninger, lav pH, høy pH, gallesyrer, fukt, høy eller lav osmolaritet, høyt

30 salt-innhold, eller kombinasjoner av disse. De mikrobielle utformingene i samsvar med foreliggende oppfinnelse er særlig egnet for bruk i probiotiske, startkulturer, biokontrollerende og bioforebyggende forbindelser.

I et andre aspekt, framskaffer foreliggende oppfinnelse en framgangsmåte for framstilling av en mikrobiell utforming med en økt levedyktighet/restitusjons rate i et produkt, framgangsmåten omfatter dyrking eller kultivering av mikrober i medier basert på eller inneholdende resistent stivelse, slik at de dyrkede mikrobene vil ha en økt overlevelses/

5 restitusjons rate når de etterpå benyttes i et produkt, og høsting av de dyrkede mikrobene har en økt overlevelses/restitusjons rate, hvorved mikrobene i en etterfølgende anvendelse i et produkt, har en økt overlevelses/restitusjons rate i produktet, sammenlignet med de samme mikrobene dyrket eller kultivert i et medium uten resistent stivelse og benyttet i et lignende produkt.

10 I et tredje aspekt, framskaffer foreliggende oppfinnelse en bedret mikrobiell utforming med en økt overlevelses/restitusjons rate i et produkt som framstilles i samsvar med framgangsmåten, ifølge det andre aspektet av foreliggende oppfinnelse.

I et fjerde aspekt, framskaffer foreliggende oppfinnelse et produkt som inneholder mikrober med en økt overlevelses/restitusjons rate, produktet inkluderer en mikrobiell

15 utforming i samsvar med det første eller tredje aspektet av oppfinnelsen.

Produktet er fortrinnsvis mat, fôr, nutrasøytiske, farmasøytiske, biokontrollerende eller bioforebyggende produkt. I en foretrukket utførelse, inkluderer matproduktet også resistent stivelse, for slik å ytterligere fremme vekst/utbytte potensialet, eller overlevelses/restitusjons raten for mikrobene.

20 I et femte aspekt, angår foreliggende oppfinnelse bruk av resistent stivelse i et mikrobielt vekstmedium for å framstille mikrober med en økt overlevelses/restitusjons rate i et produkt, sammenlignet med de samme mikrobene dyrket eller kultivert i mediet uten resistent stivelse.

En form for resistent stivelse som er særlig egnet for foreliggende oppfinnelse, er stivelse
25 inneholdende resistent stivelse. Stivelsene har fortrinnsvis et amylose-innhold på minst 40 vekt%. I en foretrukket form, er stivelsen fra mais som har et amylose-innhold på minst 70 vekt %, minst 80 vekt %, eller minst 90 vekt%. Stivelsen kan også være kjemisk, fysikalsk eller enzymatisk behandlet eller modifisert. Kjemisk modifisering kan være oksidering, kryss-binding, eterifisering, esterifisering, syredannelse, dekstrinisering, eller blandinger av
30 disse. Stivelsene kan også behandles for å fremme innholdet av resistent stivelse ved et antall fysikalske eller kjemiske hjelpemidler. Et foretrukket hjelpemiddel er å varme-behandle stivelse i nærvær av fukt (varme-fukt behandling), hvilket kan oppnås ved et antall prosesser, inkludert varming under negativt, atmosfærisk, eller positivt trykk ved høyt

fukttinnhold, eller sykliske teknikker gjennom forskjellige temperaturer og trykk. Varming kan være i området 100 til 180°C, fortrinnsvis rundt 120 til 150°C og fukt-innhold på 10 til 80 %, fortrinnsvis 20 til 60 %. Gjentatt autoklaving og rask kjøling kan også benyttes for å øke innholdet av resistent stivelse i stivelsene. Det skal bemerkes at disse prosessene og forholdene kan endres for å oppnå den ønskete økningen i nivået av resistent stivelse i stivelsene som behandles. Behandling kan også være løsningsmiddel ekstraksjon for å fjerne fett og/eller mineraler fra stivelsen.

Det er en mengde probiotiske mikroorganismer som er egnet for bruk i denne oppfinnelsen, inkludert gjær fra så som *Saccharomyces* og bakterier så som av slekten *Bifidobacterium*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *peptostreptococcus* og *Lactobacillus*. Oppfinnelsen er imidlertid ikke begrenset til disse særlige mikro-organismene. Startkulturene inkluderer fortrinnsvis, men ikke nødvendigvis, melkesyrebakterier inkludert *Lactobacillus*, *Lactococcus* og *Streptococcus*, *Leuconostoc* og gjær. Mikro-organismene for bruk i biokontrollerende og bioforebyggende produkt inkluderer fortrinnsvis *Bifidobacteria*, *acidophilus*, sopp, *Bacillus* arter, *Pseudomonas* og *Alcaligenes*. Det skal imidlertid bemerkes at andre slekter av mikroorganismer også vil være egnede kandidater for bruk i samsvar med foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnelsen inkluderer også mikroorganismer av ulike stammer eller arter, inkludert de som ikke nyttiggjør seg av stivelse, for å virke på hverandre og vise bedret vekst og/eller aktivitet i tykktarmen, nesehulen eller vagina området.

I en foretrukket utførelse i samsvar med det første, andre, tredje, og fjerde aspektet av foreliggende oppfinnelse, er de mikrobielle utformingene startkulturer eller probiotiske utforminger som kan være flytende, frossen eller tørket. Framstillingene kan også inkludere mat og fôr produkter som inneholder mikrobielle tilsetninger. Disse utformingene kan også inkludere mat og fôr produkter som inneholder andre mikrobielle tilsetninger. Disse produktene inkluderer væskebaserte eller fast-stoff baserte produkter. Væskebaserte produkter inkluderer melke-baserte produkter hvor den spisebare ingrediensen er en eller flere melkebaserte ingredienser, inkludert helmelk, faste stoffer fra melk, melkefett, fløte, tørket skummet melk, enhver annen komponent eller derivat fra melk som kan benyttes i melke-baserte produkt, vannbaserte fluider, korn og plante ekstrakter så som soya baserte drikker og tilsetningsstoffer. Fast-stoff baserte matprodukter inkluderer snackstenger, frokost blandinger, brød, sukkertøy, ekstruderte matprodukter, müslistenger, boller,

kjeks, förpelleter, belagte matprodukter, tabletter, mat-tilsetninger, helse-supplementer og farmasøytiske preparater.

Matproduktene i samsvar med det fjerde aspektet av foreliggende oppfinnelse inkluderer ethvert matprodukt som er egnet til å inneholde og administrer probiotiske mikro-

5 organismer. Eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, mat, frukt-drikkevarer, vanniser, sukkertøy, belegg eller overtrekk, yoghurter, yoghurt-drikker, ufermenterte drikker, smakstilsatte melke-drikker, modifiserte melke-drikker, iskrem og meieri-desserter.

Standard metoder som anvendes innen faget, kan benyttes for å framstille maten, føret, nutrasøytiske eller farmasøytiske produkt i samsvar med det fjerde aspektet av foreliggende
10 oppfinnelse. Den resistente stivelsen kan tilsettes separat, i kombinasjon med en eller flere av ingrediensene som danner del av mat-produktet. Den resistente stivelsen kan, når den tilsettes separat, positivt og/eller synergisk samvirke med andre ingredienser i maten, føret, de nutrasøytiske eller farmasøytiske produktene.

Økningen i overlevelsesraten for mikrober i produktet relateres til en økning i den
15 forventete overlevelsesraten av de samme mikrobene i et tilsvarende produkt som ikke inneholder resistente stivelses-dyrkede mikrober.

I en foretrukket form, er den resistente stivelsen Hi-maize™, og Culture Pro™ området av resistente stivelses-produkter. Disse resistente stivelsene kan benyttes i vekstmedium i en konsentrasjon på omtrent 0,01 til 10 vekt%, og i etterfølgende tilsetninger under fram-
20 stillingen av de mikrobielle utformingene og i flytende føde, før, nutrasøytiske og farmasøytiske produkter. Den resistente stivelsen blir fortrinnsvis benyttet i 0,1 til 5 vekt%, og mer foretrukket omtrent 1 vekt%. Stivelsen som inneholder resistent stivelse og/eller kostfiber kan benyttes i tørrmat, før nutrasøytiske eller farmasøytiske produkt, og mikrobielle framstillinger, i en konsentrasjon på omtrent 0,1 til 99 vekt% totalt produkt eller fram-
25 stilling. Fortrinnsvis blir stivelsen benyttet i omtrent 1 til 10 vekt%.

Det er funnet at resistent stivelse er særlig egnet i fluid-baserte matvarer i en konsentrasjon på 0,1 til 5 vekt%, i fast-stoff baserte matprodukter på 0,1 til 15 vekt%, og i før, nutrasøytiske eller farmasøytiske produkt på 0,1 til 95 vekt%.

En ytterligere fordel ved bruk av resistent stivelse er at ytterligere resistent stivelse også
30 kan settes til ved ethvert trinn under framstillingen av maten, føret, det nutrasøytiske eller farmasøytiske produktet. Egenskapene ved den resistente stivelsen blir ikke negativt påvirket av prosessen ved framstilling av de bearbejdede produktene. En særlig fordel er at det ikke er noe behov for å tilsette den resistente stivelsen i steril form ved slutten av

prosessen. Produktet kan pasteuriseres eller lignede uten bekymring for å påvirke egen-
skapene ved stivelsene negativt.

Slik det benyttes i denne beskrivelsen, inkluderer "resistent stivelse" de former som er
definert som RS1, RS2, RS3 og RS4, av Brown, McNaught og Moloney (1995) Food
5 Australia, 47:272-275. Enten modifisert eller umodifisert resistent stivelse eller baldninger
av disse, kan benyttes i foreliggende oppfinnelse.

I WO 94/03049 og WO 94/14342, er det omtalt høy-amylose stivelser som er resistente
stivelser og inkluderer mais-stivelse med et amylose-innhold på 50 vekt% eller mer, særlig
80 vekt% eller mer, ris-stivelse med et amylose-innhold på 27 vekt% eller mer, eller en
10 hvete-stivelse med 35 vekt% eller mer. Videre har spesielle korn-størrelses-områder av
stivelser et amylose-innhold på 50 % eller mer, og forbedret resistent stivelses-innhold,
disse stivelsene inkluderer mais, bygg og belgplanter. Denne oppfinnelsen er imidlertid ikke
begrenset til disse typene av resistent stivelse. For eksempel er andre former av resistent
stivelse utledet fra kilder så som bananer og rotvekster så som poteter og modifiserte former
15 av disse.

Kjemiske modifiseringer, så som oksidasjon, kryssbinding, eterifisering, esterifisering,
syredannelse, dekstrinisering og lignende er egnede kjemiske behandlinger som er velkjente
innen faget. På samme måte kan andre modifiseringer inkluderes fysisk, enzymatisk eller
ved andre hjelpemidler som er velkjente for fagpersoner.

20 Det kan også være nyttig å modifisere graden av enzym-følsomhet av den resistente
stivelsen, ved å endre konformasjonen eller strukturen av stivelsen. Eksempler inkluderer
syre- eller enzym-fortynning og kryss-binding ved bruk av di-funksjonelle reagenter,
varme/fukt behandling og varme gløding. Modifisering av stivelsen kan også utføres ved
manipulering av krystalline-strukturen av stivelsen. Slike modifiserings-metoder er kjent
25 innen faget, og stivelsene som blir produsert med disse metodene er egnet for den fore-
liggende oppfinnelsen.

Fortrinnsvis er de resistente stivelsene utledet eller oppnådd fra mais. Det skal imidlertid
bemerkes at andre kilder for resistent stivelse kan benyttes i foreliggende oppfinnelse.
Eksempler inkluderer kornslag som sorghum, hvete, bygg, havre og ris, rotvekster som
30 poteter og tapioca, belgplanter så som erter, og andre inkludert stivelse fra genetisk
modifiserte plante-arter.

Slik det benyttes her, referer "Hi-maizeTM" og "Culture ProTM" til produkter som oppnås
fra høy-amylose stivelse inneholdende over 70% amylose oppnådd fra Starch Australiasia

Limited. Høy-amylose stivelser som inneholder resistente stivleser som er egnet for foreliggende oppfinnelse er beskrevet i AU 660560.

I denne beskrivelsen, med mindre teksten krever noe annet, skal ordet "omfatte" eller variasjoner så som "omfatter" eller "omfattende" forstås som å inneholde det gitte

- 5 elementet, tallet eller trinnet, eller gruppen av elementer, tall eller trinn, men ikke utelukke andre element, tall eller trinn, eller grupper av elementer, tall eller trinn.

For at oppfinnelsen klarere skal forstås, vil foretrukne former beskrives med henvisning til de følgende eksemplene og figurene.

- 10 Figur 1 viser vekst av *Bifidobacterium* stamme D, med og uten stivelse,
 figur 2 viser vekst av *Bifidobacterium* stamme E, med og uten stivelse,
 figur 3 viser vekst av *Bifidobacterium* stamme C, med og uten stivelse,
 figur 4 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i en probiotisk
 basert drikk, evaluert for *Bifidobacterium* stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose
 15 (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2
 (0,5%) + glukose (0,25%),
 figur 5 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i en yoghurt-type
 basert fermentert melke-drikk, evaluert for *Bifidobacterium* stamme C, som var dyrket i
 nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2
 20 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose (0,25%),
 figur 6 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i appelsinjuice,
 evaluert for *Bifidobacterium* stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller
 stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) +
 glukose (0,25%),
 25 figur 7 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i en probiotisk
 basert drikk med tilsats av ytterligere resistent stivelse, evaluert for *Bifidobacterium* stamme
 C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%),
 eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose (0,25%),
 figur 8 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i en yoghurt-type
 30 fermentert melke-drikk med tilsats av ytterligere resistent stivelse, evaluert for
Bifidobacterium stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1
 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose
 (0,25%),

figur 9 viser overlevelse/rekonstitusjon av stivelses-dyrkede mikrober i appelsinjuice med tilsats av ytterligere resistent stivelse, evaluert for *Bifidobacterum* stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose (0,25%),

5 figur 10 viser overlevelse/rekonstitusjon av stammer utsatt for en fryse-tine syklus etter vekst i nærvær av resistent stivelse, *Bifidobacterum* stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,5%) eller stivelse 1 (0,5%) + glukose (0,25%),

figur 11 viser overlevelse/rekonstitusjon av stammer utsatt for en fryse-tine syklus etter vekst i nærvær av resistent stivelse, *Bifidobacterum* stamme C, som var dyrket i nærvær av stivelse 1 (0,25%) + glukose (0,25%) med tilsats av ytterligere stivelse 1,

figur 12 viser overlevelse/rekonstitusjon av stammer utsatt for en fryse-tine syklus etter vekst i nærvær av resistent stivelse, *Bifidobacterum* stamme C, som var dyrket i nærvær av stivelse 2 (0,5%) med tilsats av ytterligere stivelse 1,

figur 13 viser overlevelsen av *Bifidobacterum* stamme C, dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose (0,25%), og deretter plassert i ulike typer yoghurt uten tilsatt stivelse, og

figur 14 viser overlevelsen av *Bifidobacterum* stamme C, dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelses 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,5%) + glukose (0,25%), og deretter plassert i ulike typer yoghurt med tilsatt stivelse.

Metoder for å utøve oppfinnelsen

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse fant at tilsetning av resistent stivelse til mikrobielt vekstmedium og valgfritt i etterfølgende trinn ved produksjon av mikrobielle utforminger inneholdende resistente stivelses-dyrkede mikrober, resulterte i en overraskende og uventet økning i vekst restitusjonen og/eller overlevelsen av mikrobene under produksjon og lagring av utformingene og produktene.

Eksempel 1

Bifidobakterie stamme LaftiTM ble anaerobisk dyrket på et basalt agar-medium (BM) tilsatt 1 vekt% enten glukose eller resistent stivelse (Culture ProTM). Etter dyrkingen, ble cellene høstet fra platene ved bruk av fosfatbufret saline (PBS) og like mengder ble blandet med enten PBS eller PBS med stivelses-korn (10 vekt%). Like mengder av blandingen ble frysetørket. Følsomheten av LaftiTM 13 B cellene overfor lav pH ble analysert ved å forøke

bakterie-blandingene før frysetørking og rehydrere etter frysetørking, med glysinbuffer ved pH 3,5. De levedyktige cellene ble regnet opp ved å bestemme antall koloni dannende enheter ved bruk av Tryptone Yeast Extract Peptone plater (TYP) ved tilsats til pH 3,5 og etter 3 timer. Reduksjonen i levedyktighet etter 3 timer er presentert i tabell 1. Det ble lagt merke til at celler dyrket i nærvær av stivelse var mer resistente og at inneslutningen av stivelse ytterligere bedret resistensen.

Tabell 1 Reduksjon i levedyktighet etter 3 timer, av Bifidobakterie celler		
	Nærvær av stivelse etter vekst	Reduksjon i levedyktighet
Glukose-dyrkede celler	-	26×10^2
Glukose-dyrkede celler	+	15×10^2
Stivelses-dyrkede celler	-	26
Stivelses-dyrkede celler	+	5

10 Eksempel 2

Bifidobakterie stammen LaftiTM 13B ble predyrket i Basal kraft (eng. broth) (BM), supplementert med 1 vekt% glukose eller høy-amylose mais-stivelses-korn (Culture ProTM). Anaerobt dyrkede kulturer ble innokulert (10 µl) på BM agaren eller i kraften, begge mediene inneholdt 1 vekt% glukose eller Culture ProTM. Platene ble enten dråpe innokulert eller spredt og deretter anaerobt inkubert i 48 timer. Vekst i kraft eller celler høstet fra "spredt" platene ble kvantifisert ved å telle koloni formende enheter (CFU). Vekst på dråpe innokulerte plater ble kvantifisert ved å måle størrelsen av kolonien, samt størrelsen av den klare sonen rundt kolonien, som et mål på utnyttelse av stivelsen, av Bifidobakterie cellene. Det ble bemerket at LaftiTM 13B cellene vokste fortere på stivelses-holdig medium når de var pre-dyrket på stivelses-holdig medium, og produserte større kolonier og større klare soner på agar-plater inneholdende stivelse. Videre var utbyttet større fra stivelses-holdige medium, sammenlignet med glukose-medium, for celler som var predyrket i både kontroll-kraft (glukose) og stivelses-kraft.

25 Resultat

Restitusjon av levedyktige mikroorganismer etter vekst i nærvær av stivelse, var høyere og raskere enn glukose-kontrollene.

Vekst i stivelses-medium fremmet utbyttet av mikroorganismer etter at de hadde vært utsatt for stressende forhold, for eksempel lav pH, gallesyrer, syrer, varme, fukt, trykk,
5 fryse-tørring, spray-tørring enkeltvis eller i kombinasjon.

Predyrking i stivelses-medium før vekst i stivelses-medium fremmet restitusjonen/ over-levelsen etter utsettelse for stressende forhold som angitt ovenfor, samt at det fremmet utbyttet.

Vekst i stivelses-medium og deretter tilsats av stivelse, fremmet motstanden overfor
10 stressende forhold som angitt ovenfor.

Oppfinnelsen blir ytterligere illustrert ved de følgende eksemplene ved bruk av to stivelser omfattende resistent stivelse, omtalt som stivelse 1 (omtrent 20 vekt% resistent stivelse) og stivelse 2 (omtrent 60 vekt% resistent stivelse), som var granulære høy-amylose mais-stivelser, samt et antall *Bifidobacterium* stammer, omtalt som A, B, C, D, E og F.

15

Eksempel 3

Vekst og utbytte av *Bifidobacterium* stamme D, *Bifidobacterium* stamme E og *Bifidobacterium* stamme C ble analysert i nærvær av naturlig kornformet mais-stivelse. En forkultur av stammen ble dyrket i 20 ml PYG kraft i 18 timer, og brukt for å innokulere (0,1
20 ml deler) 20 ml PY vekstmedium inneholdende enten glukose (0,5%), stivelse 1 (0,5%), stivelse 2 (0,5%) eller en blanding av stivelse 1 (0,25%) og glukose (0,25%). Kulturene ble inkubert i et anaerobt kammer ved 37°C, og det ble tatt prøver ved 0, 4, 7, 12, 24, 31, 48 og 72 timer for å overvåke antall levedyktige celler, bestemt som koloni dannende enheter per ml kultur (CFU/ml⁻¹). Resultatene presentert i Figur 1 for *Bifidobacterium* stamme D, viser
25 at tilsatsen av stivelse 1 (0,25%) sammen med 0,25% glukose resulterte i en forbedret vekst og utbytte av stamme D, i forhold til bare 0,5% glukose. For *Bifidobacterium* stamme E (figur 2) var veksten raskere i stivelse 2 kraft, sammenlignet med glukose kontrollen. Veksten for stamme E ble også forbedret i stivelse 1 + glukose kraften, sammenlignet med kontrollen. Et annet vekst-mønster og utbytte ble notert for *Bifidobacterium* stamme C.
30 Som vist i figur 3, selv om vekst-hastigheten ikke var betydelig forskjellig i de forskjellige mediene, døde denne stammen forholdsvis fort, straks maksimalt utbytte ble nådd ved omtrent 18 timer, når stammen ble dyrket i glukose. Stammen oppnådde et høyere utbytte når stivelse 1 eller stivelse 2 var inkludert.

Eksempel 4

Overlevelsen/restitusjonen av stivelses-dyrkede mikrober i mat, ble vurdert for *Bifidobacterium* stamme C, som var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelse 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,25%) + glukose (0,25%). Bifidobakterie cellene ble samlet etter 30 timer anaerob vekst, og fortynnet i matvarene til å gi omtrent 10^5 CFU pr ml mat. De matvarene som ble utprøvd inkluderer appelsinjuice, en probiotisk basert drikk og et yoghurt type fermentert melke-produkt. Matproduktene inneholdende *Bifidobacterium* stamme C celler ble lagret ved romtemperatur (for akselererende lagrings-forhold) og det ble tatt prøver ved 0, 1, 2, 5, og 6 dager for å kvantifisere levedyktigheten av *Bifidobacterium* stamme C cellene. Fra resultatene som er presentert i figur 4, forekom fremmet overlevelsen av stamme C i den probiotiske baserte drikken, når stammen tidligere var dyrket i nærvær av stivelse 1 og 2. På samme måte forekom ble det lagt merke til en fremmet overlevelse av stamme C i det yoghurt-type fermenterte melkeproduktet. For celler dyrket på stivelse (figur 5) og i appelsin-juice for celler dyrket på stivelse (figur 6).

Eksempel 5

Inneslutningen av ytterligere stivelse i mikroorganismer dyrket i nærvær av resistent stivelse, resulterte i fremmet overlevelse når mikroorganismene ble satt til mat-produkter. Dette ble undersøkt ved bruk av *Bifidobacterium* stamme C, som hadde blitt dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelse 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,25%) + glukose (0,25%). Bifidobakterie cellene ble samlet etter 40 timers anaerob vekst, og blandet med 2,5% stivelse 1 i 1 time. Cellene og stivelses-kornene ble deretter samlet ved sentrifugering, og satt til mat-produktet til omtrent 10^5 CFU per ml matvare. Matvarene som ble undersøkt inkluderte appelsin-jucie, en probiotisk basert drikk, og et yoghurt-type fermentert melke-produkt. Matvare-produktene inneholdende *Bifidobacterium* stamme C cellene med ytterligere stivelse ble lagret ved romtemperatur (for akselererende lagrings-forhold) og det ble tatt prøver ved 0, 1, 2, 5, og 6 dager for å kvantifisere overlevelsen av *Bifidobacterium* stamme C cellene. Fra resultatene som er presentert i figur 7, forbedret stivelse 1 overlevelsen av bakteriene i en probiotiske baserte drikk, uansett hvilket medium som ble benyttet, og som vist i figur 8, i et yoghurt-

type fermentert melkeprodukt. Den ytterligere stivelsen forbedret også overlevelsen av stamme C i appelsinjuice (se figur 9).

Eksempel 6

- 5 Ved bruk av *Bifidobacterium* stamme C, ble hunn-mus omtrent 20 g, orogastrisk intubert med en suspensjon av celler, høstet fra glukose-baserte plater eller stivelse 1 og stivelse 2 baserte plater. De bakterielle suspensjonene ble standardisert til en konstant optisk tetthet, tilsvarende omtrent 10^8 per ml fortynnings-middel. Bifidobakterie-cellene i prøver av fersk avføring ble telt opp ved bruk av PAM agar plater, og identifikasjon bekreftet ved bruk av
- 10 PCR. Avførings-prøvene ble samlet ved 4, 10, 24 og 48 timer etter administrasjon av bifidobakteriene. Ingen bifidobakterie-celler ble detektert i mus tilført glukose-dyrkede celler (tabell 2). Mus tilført med stamme C dyrket på stivelse 1 agar, hadde omtrent log 7 CFU per gram våtvekt avføring detektert ved 4 og 10 timer etter oral administrasjon. Antallet avtok i 24 og 48 timers prøvene, men var fremdeles detekterbare. Når
- 15 *Bifidobacterium* stamme C dyrket på stivelse 2 agar ble orogastrisk dosert til mus, ble omtrent log 8 CFU per gram våtvekt avføring detektert 4 og 10 timer etter administrasjon, med en nedgang for 24 og 48 timers prøvene. Det ble konkludert med at vekst på resistent stivelses-basert agar ga bifidobakterie celler som var mer resistente overfor *in vivo* forhold, hvilket vil inkludere lav mage pH, gallesyrer og bukspytt-kjertel enzymer.

20

Tabell 2			
Restitusjon av <i>Bifidobacterium</i> stamme C fra fersk avføring fra mus, orogastrisk dosert med <i>Bifidobacterium</i> stamme C celler som var dyrket enten på glukose-agar, stivelse 1 agar eller stivelse 2 agar. Resultatene er presentert som CFU per gram våtvekt avføring.			
Tid etter dosering (h)	Glukose agar	Stivelse 1 agar	Stivelse 2 agar
	(CFU per gram våtvekt)		
4	ND	$5,8 * 10^6$	$2,5 * 10^8$
10	ND	$2,5 * 10^7$	$6,0 * 10^7$
24	ND	$> 10^6$	$> 10^6$
48	ND	$> 10^5$	$> 10^5$

ND- ingen detektert.

Eksempel 7

Mikroorganismer dyrket i nærvær av resistent stivelse viste seg å være mer resistent overfor fysisk stress, som illustrert av det følgende eksemplet, hvorved bifidobakterie stammer ble utsatt for en fryse-tine syklus, etter dyrking i nærvær av resistent stivelse.

- 5 *Bifidobacterium* stamme C var dyrket i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelse 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,25%) + glukose (0,25%).

Bifidobakterie cellene ble samlet etter 40 timers anaerob vekst, prøvene ble delt i to. En del ble frosset ned direkte (-20°C) og den andre ble blandet med 2,5% stivelse 1 i 1 time.

- Cellene og stivelses-kornene ble deretter samlet ved sentrifugering, og også frosset ved -
10 20°C. De levedyktige bifidobakterie cellene ble kvantifisert etter 0, 1, 2, 3 og 4 fryse-tine sykluser, som omfattet tining av prøvene ved romtemperatur hver dag i 4 dager. Som presentert i figur 10, fremmet vekst i nærvær av resistent stivelse forut det fysiske stresset, overlevelsen av bifidobakteriene. Dessuten bedret tilsatsen av ytterligere resistent stivelse før frysing, overlevelsen av bifidobakterie cellene, ytterligere (se figur 11 og 12).

15

Eksempel 8

Bakterier som var dyrket i nærvær av resistent stivelse, og deretter frysetørket før lagring ved forhøyete temperaturer, var mer resistente overfor forhøyete temperaturer, enn de som var dyrket i fravær av stivelse. Tre *Bifidobacterium* stammer A, B og D ble hver dyrket i
20 fermentorer med pH-kontroll. Celle-biomassen ble høstet og frysetørket. Det tørre pulveret ble deretter lagret ved 42°C i 7 dager og det ble tatt prøver daglig i 4 dager, og så igjen på dag 7 for å kvantifisere de levedyktige bifidobakteriene. Resultatene er uttrykt som koloni dannende enheter per gram tørt pulver. Som vist i tabell 3, overlevde cellene som ble dyrket i nærvær av stivelse 1 bedre, eller restituerte i høyere antall enn de som var dyrket i fravær
25 av den resistente stivelsen.

Tabell 3 Levedyktigheten av frysetørkede <i>Bifidobacterium</i> stammer A, B og D, ved inkubasjon ved 42°C						
Tid (d)	Stamme A		Stamme B		Stamme D	
	Uten stivelse	Med stivelse	Uten stivelse	Med stivelse	Uten stivelse	Med stivelse
0	10,52	10,59	10,58	10,56	10,65	10,58
1	10,30	10,23	10,23	10,40	10,11	10,20

Tabell 3 Levedyktigheten av frysetørkede <i>Bifidobacterium</i> stammer A, B og D, ved inkubasjon ved 42°C						
2	9,11	10,11	7,83	10,08	7,76	9,83
3	7,26	10,00	5,00	9,53	5,00	8,53
4	4,60	9,48	4,00	8,08	4,00	5,68
7	0,00	8,04	0,00	0,00	0,00	1,30

Eksempel 9

Overlevelsen av *Clostridium butyricum* ble overvåket etter vekst i kraft uten tilsats av stivelse. Cellene ble høstet og resuspendert i pH 3,8 buffer inneholdende 2,5 % stivelse 1, 2,5 % stivelse 2, 2,5 % cellulose eller 2,5 % stivelse 3, og de resulterende levedyktige cellene ble kvantifisert etter 3 timer. Resultatene er uttrykt som prosent i forhold til den initiale levedyktighets-tellingen. Som det kan ses fra figur 4, fremmet nærvær av stivelse 2 levedyktigheten. Cellulose beskyttet ikke mot tap av levedyktighet, hvilket ble bemerket for resistent stivelse.

10

Tabell 4 Overlevelse av <i>Clostridium butyricum</i> dyrket i fravær av resistent stivelse og deretter kombinert med 2,5 % stivelse 1, 2 eller 3, resuspendert i buffer med pH 3,8. Tapet i levedyktighet ble overvåket etter 3 timers eksponering for pH 3,8.	
Stivelses tilsats	Prosentvis levedyktig etter 3 timer ved pH 3,8.
Uten stivelse	80,5
Stivelse 1	71,3
Stivelse 2	111,3
Cellulose	ND
Stivelse 3	66,0

ND = ingen detektert

15 Eksempel 10

Det ble vist at det er synergi mellom mat-ingredienser så som polysakkarider, og den bedrete effekten av overlevelse av mikroorganismer, når de er dyrket i nærvær av resistent stivelse og/eller når resistent stivelse tilsettes sammen med mikrobene. Dette kan vises ved dyrking av *Bifidobacterium* stamme C i nærvær av glukose (0,5%), eller stivelse 1 (0,25%) + glukose (0,25%), eller stivelse 2 (0,5%), eller stivelse 2 (0,25%) + glukose (0,25%).

Bifidobakterie cellene ble samlet etter 40 timers anaerob vekst, prøvene ble delt i to. En del ble brukt direkte og den andre ble blandet med 2,5 % stivelse 1 i 1 time. Cellene eller cellene og stivelses-kornene, ble deretter samlet ved sentrifugering, og resuspendert i en yoghurt-type fermentert melk, som ble lagret ved romtemperatur, hvor det ble tatt prøver ved 0, 1, 2, 5, og 6 dager for å teste levedyktige bifidobakterier. Som kan ses fra figur 13 og 14, var det en påviselig synergi mellom tilstedeværelsen av polysakkarid i yoghurt B og veksten i nærvær av resistent stivelse, i forhold til glukose.

Eksempel 11

Det ble bevist at bakterie-celler festet til ei overflate, overlever stress-forhold bedre enn de som ikke er festet. I dette eksemplet ble det oppdaget at bifidobakterie celler dyrket i resistent stivelse 1, festet seg dobbelt så godt til stivelse 1 korn, enn hva som ble funnet for glukose dyrkede celler. Celler av *Bifidobacterium* stamme C ble dyrket i PYG i 24 timer og ble etter høsting ved sentrifugering, resuspendert i en løsning av 2,5 % stivelse 1 ved pH 7,0 eller ved pH 2,5. Etter en time inkubasjon, ble adhesjonen til stivelses-kornene vurdert, og deretter ble pH endret fra 7,0 til 2,5 og også fra 2,5 til 7,0. Som kan ses fra tabell 5, adherer celler av stamme C godt ved pH 7,0, men ikke ved pH 2,5, og da pH ble endret fra 7,0 til 2,5 forble cellene festet, mens det var en økning i adhesjon da pH ble økt fra 2,5 til 7,0.

Tabell 5			
Effekt av pH på adhesjon av <i>Bifidobacterium</i> stamme C til stivelse 1			
Målinger etter 1 time		Målinger etter 2 timer	
pH	Adhesjon (%)	pH	Adhesjon (%)
7,0	88,8	7,0	86,7
2,5	18,3	2,5	13,4
7,0	88,1	pH endres til 2,5	75,5
2,5	19,51	pH endres til 6,8	72,8

Anvendelser

(i) Oppfinnelsen kan anvendes for situasjoner hvorved probiotiske mikrober kan benyttes, inkludert bruk som profylaktiske og terapeutiske forbindelser,

5 (ii) Oppfinnelsen kan anvendes i situasjoner hvorved probiotiske mikrober kan benyttes for ikke-fordøyelses-system anvendelser så som nese- og vagina-hulen.

(iii) Oppfinnelsen kan anvendes i situasjoner som angår biokontroll og bioforebyggelse.

(iv) De probiotiske mikroorganismene kan dyrkes i det stivelses-baserte mediet og benyttes direkte eller kombinert med ytterligere stivelse etter vekst. Disse probiotiske
10 suspensjoene kan benyttes direkte etter frysing og/eller etter tørking i fravær eller nærvær av ytterligere tilsetnings-stoffer.

(v) De probiotiske mikroorganismene beskrevet under (ii) ovenfor, kan settes til mat og fôr, enten under eller ved slutten av produksjonen.

(vi) I tillegg til matvarene og fôrene beskrevet under (iii) ovenfor, kan stivelsen også
15 settes til matvarer eller fôr før eller etter tilsatsen av de probiotiske mikroorganismene.

(vii) Oppfinnelsen angår også mikroorganismer, inkludert startkulturer som benyttes for produksjon av fermenterte matvarer, idet disse mikroorganismene er dyrket i stivelses-baserte medium og valgfritt blandet med ytterligere stivelse etter vekst, frysing og/eller tørking, og fremmer dermed overlevelsen av mikrobene. Når disse mikrobene settes til som
20 en ingrediens, kan ytterligere stivelse settes til maten før, under eller etter produksjon.

Oppfinnelsen dekker det faktum at for mange forskjellige mikroorganismer, inkludert probiotiske bakterier så som melkesyre-bakterier og bifidobakterier, kan nærværet av resistent stivelse i vekstmediet, i faste og flytende utforminger

øke vekst og/eller utbytte av mikroorganismer, og

25 øke overlevelses eller restitusjons raten av mikrobene i mat, helsekost inkludert nutrasøytiske og/eller funksjonell mat, helsetilskudd, matvarer og matvarer for barn og eldre, farmasøytiske produkt, medisinsk mat så som enteriske bespisnings-utforminger, dyrefôr, fôr for kjæledyr, aquakultur, fuglefôr og tilskudd, sport- og ytelses-kosttilskudd.

Selv om de gitte eksemplene hovedsakelig relateres til mat og probiotiske produkter, skal
30 det bemerkes at andre mikroorganismer som er nyttige for ulike anvendelser, for eksempel biokontroll og bioforebyggelse, kan gi økt vekst/utbytte potensial, eller økt overlevelses/restitusjons rate, ved bruk.

Vekst og overlevelse kan fremmes dersom ytterligere resistant stivelse settes til mikroorganismene etter dyrking, og selv ved tilsats til celler som er dyrket i fravær av resistant stivelse, og som deretter blir blandet med stivelse.

5 Dessuten er mikroorganismer som er dyrket i nærvær av resistant stivelse mer resistant mot stress så som ventilasjon, skjær, frysing, tørking, frysetørking, høy temperatur, lav temperatur, temperatur endringer, trykk endringer, høyt trykk, lavt trykk, lav pH, høy pH, fukt, *in vivo* forhold.

10 Den resistente stivelsen, inkludert RS1, RS2, RS3 og RS4 kan være naturlige stivelser som inneholder resistant stivelse og/eller modifikasjoner av disse, inkludert både kjemiske og enzymatiske modifikasjoner og/eller blandinger av disse. Eksempler på to forskjellige stivelser ble brukt i eksemplene, men en fagperson vil bemerke at andre former av resistant stivelse vil også være nyttig for bruk i foreliggende oppfinnelse.

Den ovenfor gjengitte forbedrete vekst/utbytte og/eller overlevelse/restitusjon gjelder også for produksjon og lagring av utforminger av mikroorganismene.

15 I tillegg var det overraskende å legge merke til en synergi med andre mat-ingredienser inkludert disakkarider, oligosakkarider og polysakkarider, når vekst/utbytte og/eller overlevelsen eller restitusjonen av mikroorganismene ble analysert. Det skal bemerkes at andre mat-ingredienser så som proteiner og fett også kan fungere synenergisk.

20 Det ble også bemerket at celler dyrket på resistant stivelse adherte bedre til stivelses-korn, hvilket igjen vil sikre bedre overlevelse eller restitusjon. Ettersom den resistente stivelsen har redusert fordøybarhet, vil det forstås at andre fordøybare forbindelser inkludert proteiner og lipider også kan fremskaffe forbedret vekst/utbytte og/eller overlevelse eller restitusjon av mikroorganismer.

25 Kjent teknikk har vist at nærvær av resistant stivelse i probiotiske sammensetninger fremmer overlevelse av probiotiske mikroorganismer under og etter konsum (AU 687253). Dette eldre patentet, av de foreliggende søkerene, viser data ved bruk av bifidobakterier med ytterligere stivelse tilsatt. I motsetning resulterer foreliggende oppfinnelse fra den uventete oppdagelsen at celler dyrket på resistant stivelse er mer robust uten tilsetning av ytterligere stivelse. Overraskende, når mikroorganismene er dyrket i nærvær av resistant stivelse, forekommer bedret vekst/ utbytte og/eller overlevelse eller rekonstitusjon av 30 mikroorganismene. Dette betyr at mikrobielle celler dyrket i nærvær av resistant stivelse er mer robust. Dessuten kan tilsats av resistant stivelse til celler dyrket i fravær av stivelse, fremme hardførheten av disse cellene.

Patentkrav:

1. Mikrobiell utforming, **karakterisert** ved å omfatte høstete mikrober som er dyrket eller kultivert i et medium basert på, eller inneholdende resistent stivelse, de høstete mikrobene
5 har en økt overlevelses/restitusjons rate, når de senere inkorporeres i et produkt, i forhold til de samme mikrobene dyrket eller kultivert i et medium uten resistent stivelse.
2. Utforming i samsvar med krav 1, **karakterisert** ved at produktet er valgt fra gruppen bestående av matvarer, fôr, nutrasøytiske, farmasøytiske, biokontrollerende og
10 bioforbyggende produkt.
3. Utforming i samsvar med krav 1 eller 2, **karakterisert** ved at den videre omfatter resistent stivelse.
- 15 4. Utforming i samsvar med et av kravene 1-3, **karakterisert** ved at den resistente stivelsen er av typen RS1, RS2, RS3 eller RS4, fortrinnsvis utledet fra stivelse valgt fra gruppen bestående av mais, ris, bygg, hvete, belgplanter, poteter og bananer.
5. Utforming i samsvar med krav 4, **karakterisert** ved at den resistente stivelsen er utledet
20 fra en stivelse som har et amylose-innhold på i det minste 40 vekt%.
6. Utforming i samsvar med krav 5, **karakterisert** ved at den resistente stivelsen er utledet fra mais-stivelse, idet mais-stivelsen fortrinnsvis har et amylose-innhold på i det minste 70 vekt%, fortrinnsvis i det minste 80 vekt%, og mer fordelaktig i det minste 90 vekt%.
- 25 7. Utforming i samsvar med et av kravene 4 - 6, **karakterisert** ved at stivelsen er kjemisk, fysisk og/eller enzymatisk behandlet eller modifisert.
8. Utforming i samsvar med krav 7, idet stivelsen blir kjemisk modifisert, **karakterisert**
30 ved at modifiseringen er oksidasjon, kryssbinding, eterifisering, esterifisering, syredannelse, dekstrinisering eller blandinger av disse.

9. Utforming i samsvar med krav 7, **karakterisert** ved at den fysiske modifiseringen er varme-fukt behandling for å fremme eller øke innholdet av resistent stivelse i stivelsen.

10. Utforming i samsvar med krav 7, **karakterisert** ved at behandlingen er løsnings-middel
5 ekstraksjon for å fjerne fett og/eller mineraler fra stivelsen.

11. Utforming i samsvar med et av de foregående krav, **karakterisert** ved at i bruk er mikrobene vesentlig resistent mot stress, inkludert ventilasjon, skjær, frysetørking, frysing, tørking inkludert høy, medium og lav vann-aktivitet, svingende temperaturer, lave
10 temperaturer, trykk og trykk endringer, lav pH, høy pH, gallesyrer, fukt, høy osmolaritet, lav somolaritet, høyt salt, eller kombinasjoner av disse.

12. Utforming i samsvar med et av kravene 1-11, **karakterisert** ved å være et probiotisk, en startkultur, et biokontrollerende eller et bioforebyggende produkt.
15

13. Utforming i samsvar med krav 12, **karakterisert** ved at mikrobene er probiotiske mikroorganismer av arten valgt fra gruppen bestående av *Saccharomyces*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, og *Lactobacillus*.
20

14. Utforming i samsvar med krav 12, **karakterisert** ved at mikrobene er startkulturer valgt fra gruppen bestående av melkesyre-bakterier inkludert *Lactobacillus*, *Lactococcus* og *Streptococcus*, *Leuconostoc* og gjær.

25 15. Utforming i samsvar med krav 12, **karakterisert** ved at mikrobene er egnet for bruk i biokontroll eller bioforebygging, valgt fra gruppen bestående av bifidobakterier, *acidophilus*, sopp, *Bacillus* arter, pseudomonader, og *Alcaligener*.

30 16. Framgangsmåte for framstilling av en mikrobiell utforming, med en økt overlevelses/restitusjons rate i et produkt, **karakterisert** ved at framgangsmåten omfatter dyrking eller kultivering av mikrober i et medium basert på eller inneholdende resistent stivelse, og innhøsting av de kultiverte mikrobene, de høstete mikrobene har økt overlevelses/

restitusjons rate når de senere inkorporeres i et produkt, i forhold til de samme mikrobene dyrket eller kultivert i et medium uten resistant stivelse.

5 17. Framgangsmåte i samsvar med krav 16, for framstilling av en utforming i samsvar med krav 1-15.

10 18. Framgangsmåte i samsvar med krav 16 og 17, **karakterisert** ved at den resistente stivelsen tilsettes mediet i en konsentrasjon på 0,01 til 10 vekt%, fortrinnsvis 0,1 til 5 vekt%, mer foretrukket 1 vekt%.

19. Produkt inneholdende mikrober med en økt overlevelses/restitusjons rate i forhold til de samme mikrobene dyrket eller kultivert i et medium uten resistant stivelse, **karakterisert** ved at produktet inneholder en mikrobiell utforming i samsvar med krav 1-15.

15 20. Produkt i samsvar med krav 19, **karakterisert** ved at det er en matvare, et fôr, et nutrasøytisk eller farmasøytisk produkt valgt fra gruppen bestående av fluid-baserte matvarer, vannbaserte fluider, matvarer basert på kornslag og planter, matvarer basert på fast fase, tabletter, tilsetnings-stoffer til mat, helsetilskudd og farmasøytiske preparater.

20 21. Produkt i samsvar med krav 20, **karakterisert** ved at de fluid-baserte matvarene inkluderer melke-baserte produkter hvor den spiselige ingrediensen er en eller flere melke-baserte ingredienser inkludert helmelk, tørrmelk, melkefett, fløte, skummeltmelk pulver, enhver annen komponent eller derivat fra melk, egnet for bruk i melkebaserte produkt.

25 22. Produkt i samsvar med krav 20, **karakterisert** ved at matvarene basert på fast fase, inkluderer snack-stenger, frokostblandinger, brød, sukkertøy, ekstruderte matprodukter, müsli-stenger, boller, kjeks, fôr-pelleter og belagte fôr-produkt.

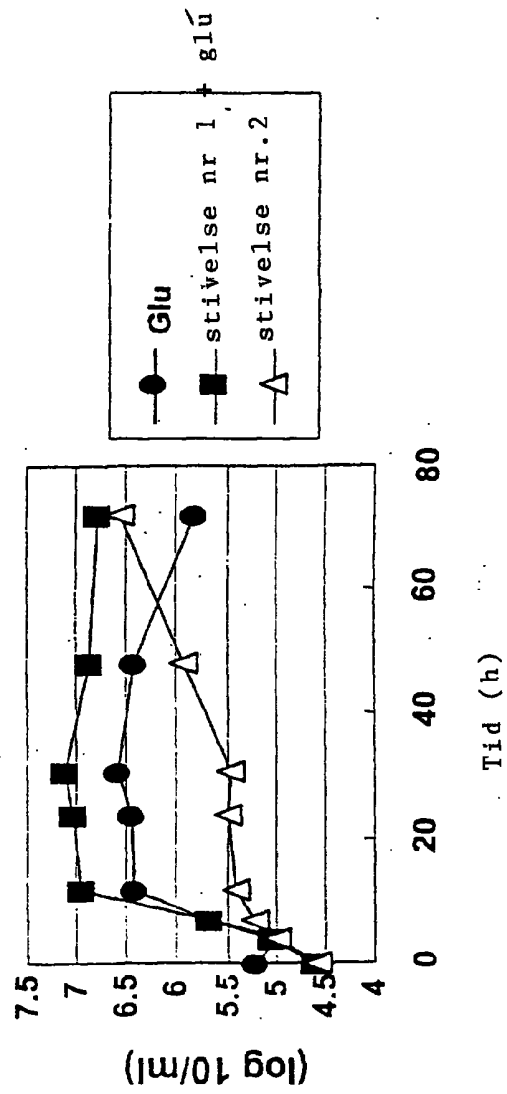
30 23. Produkt i samsvar med krav 19, **karakterisert** ved å være en matvare egnet for å inneholde og administrere probiotiske mikroorganismer, fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av mat, fruktdrikker, vanniser, sukkertøy, belegg eller overtrekk, yoghurter, yoghurt-drikker, ufermenterte drikker, smakstilsatte melke-drikker, modifiserte melke-drikker, iskrem og meieri-desserter.

24. Produkt i samsvar med krav 19, **karakterisert** ved at den resistente stivelsen tilsettes til en konsentrasjon på 0,1 til 90 vekt% av det totale produktet, fortrinnsvis 1 til 10 vekt%.

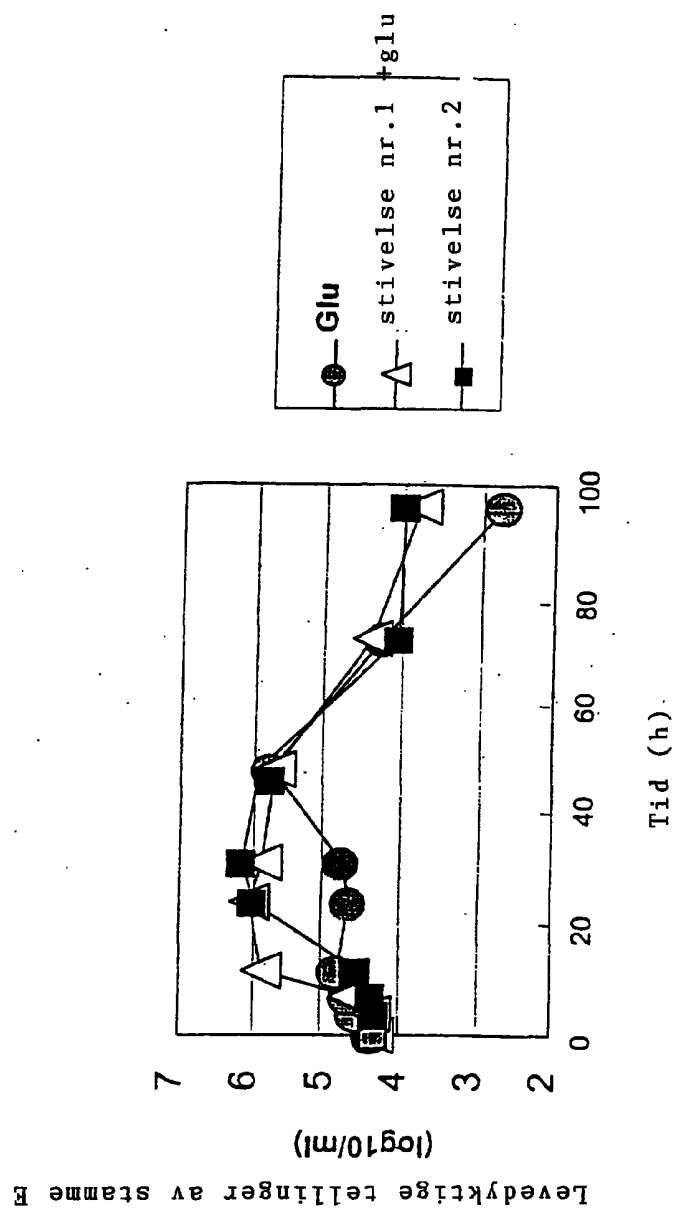
- 5 25. Bruk av resistent stivelse i et mikrobielt vekstmedium for å framskaffe mikrober som, når de senere benyttes i et produkt, etter at de er høstet fra mediet, har økt overlevelses rate i forhold til de samme mikrobene dyrket eller kultivert i et medium uten resistent stivelse.

- 10 26. Bruk i samsvar med krav 25, idet mikrobene kan benyttes i den mikrobielle utformingen i samsvar med krav 1-10.

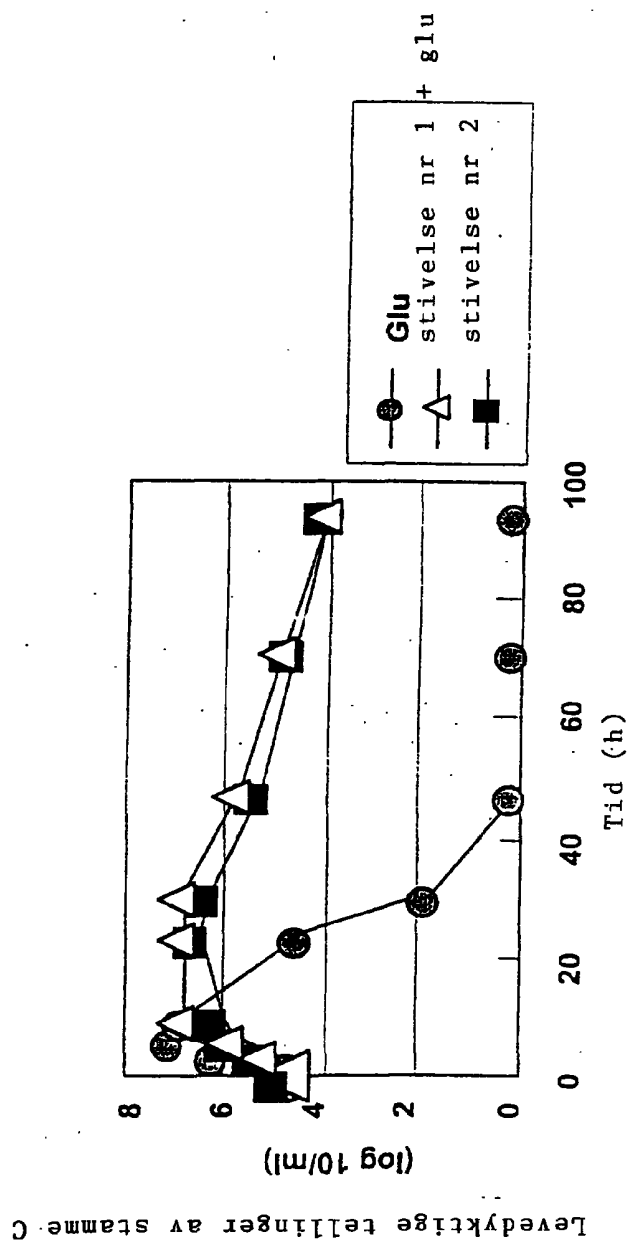
Levedyktige tellinger av stamme D



Figur 1



Figur 2



Figur 3

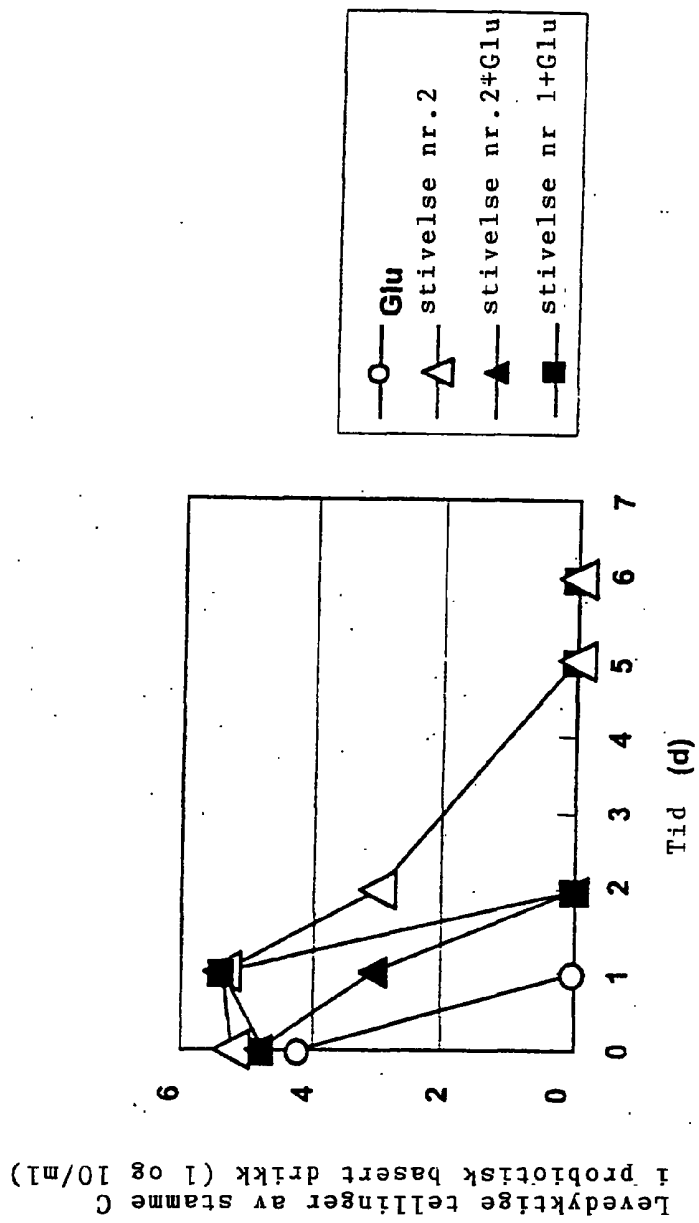
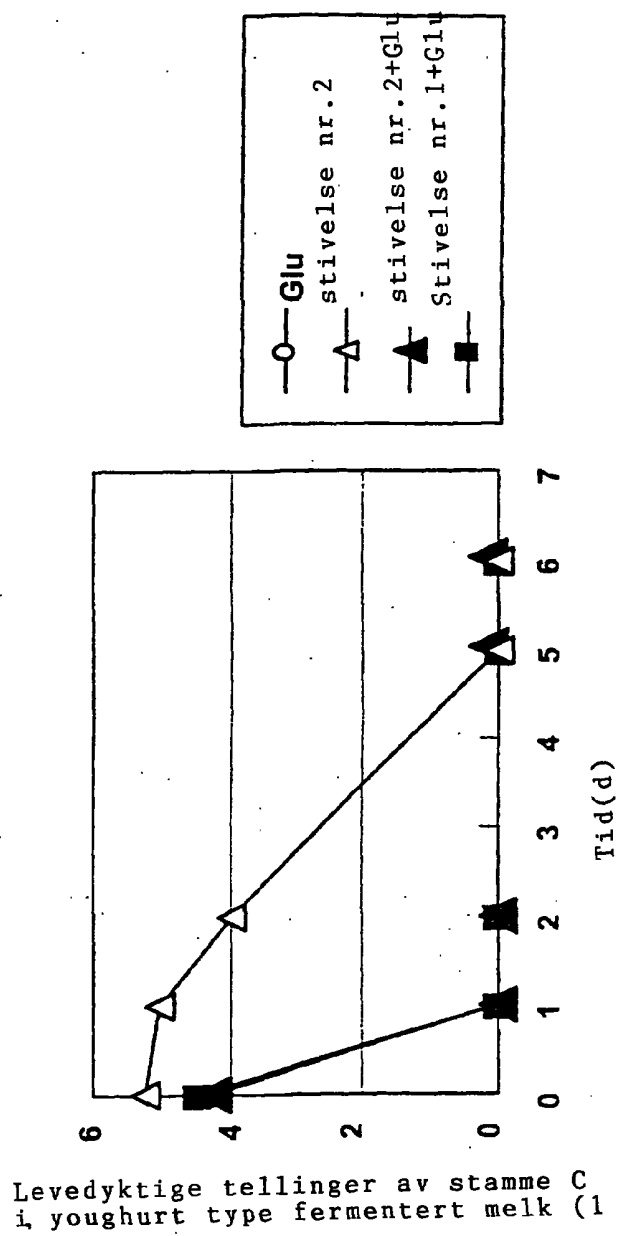
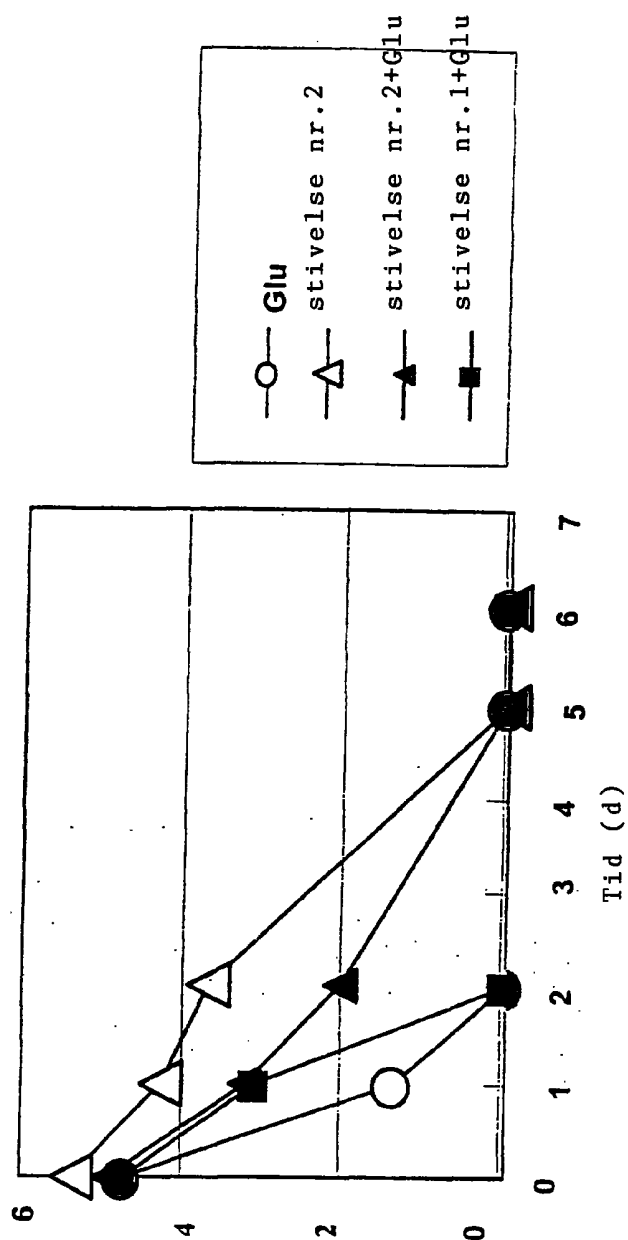


Figure 4



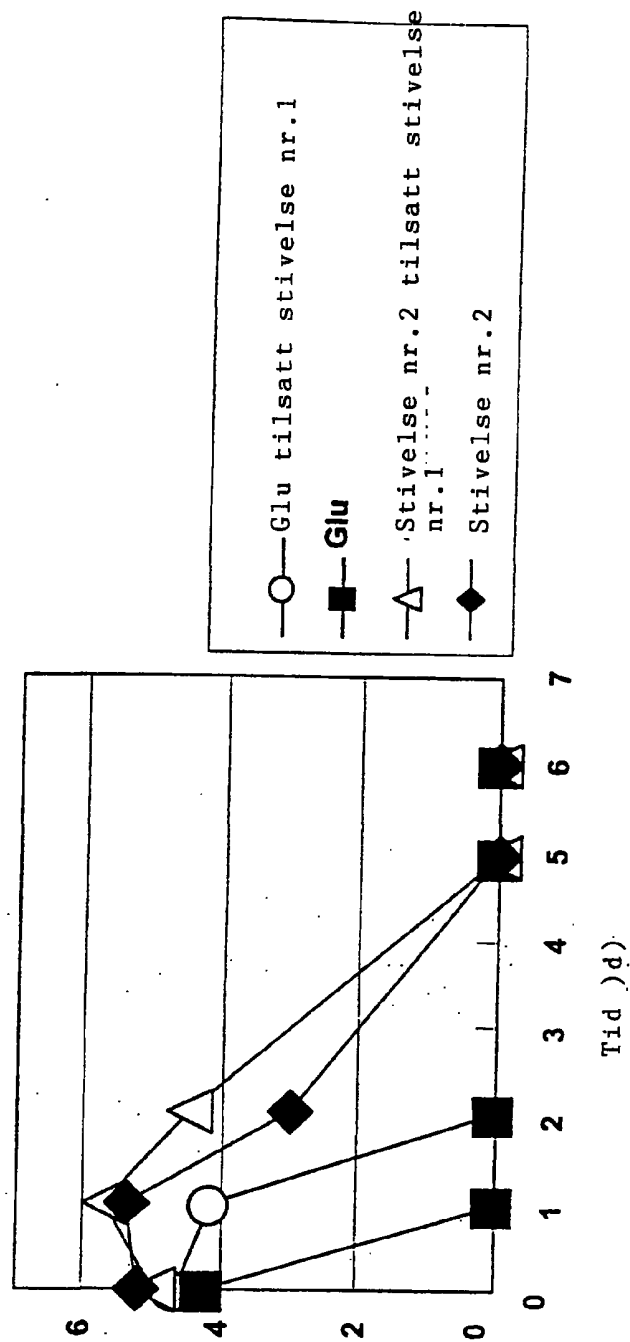
Figur 5



Figur 6

Levedyktige tellinger av stamme C
i appelsin-juice

Levedyktige tellinger av stamme C
i probiotisk basert drikk



Figur 7

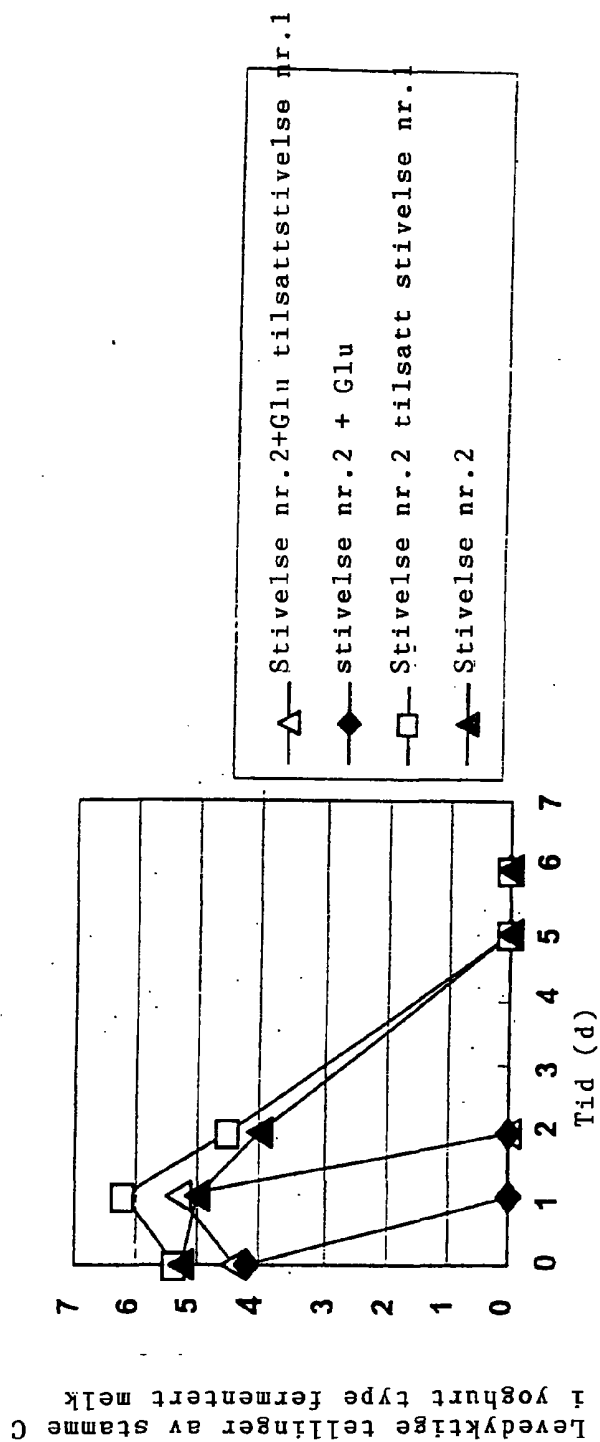
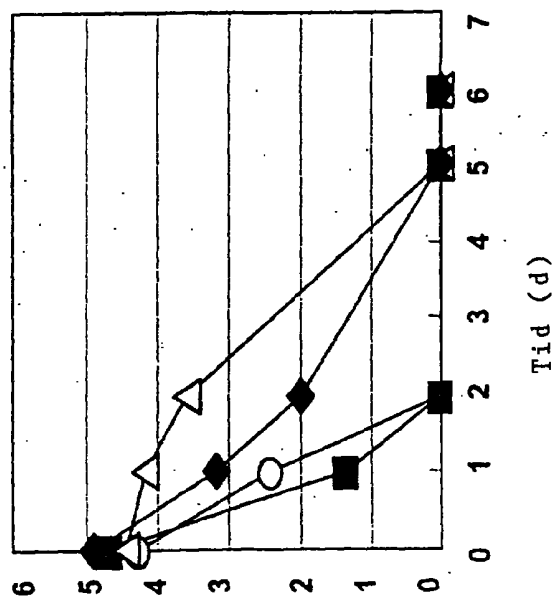
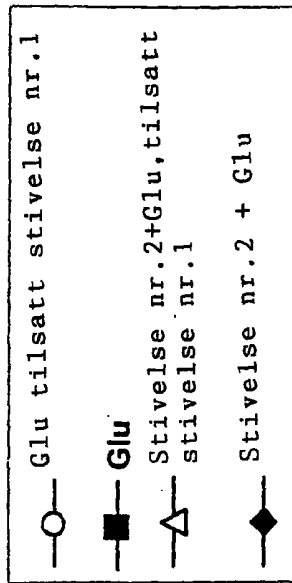


Figure 8

Levedyktige tellinger av stamme C
i appelsin-juice



Figur 9



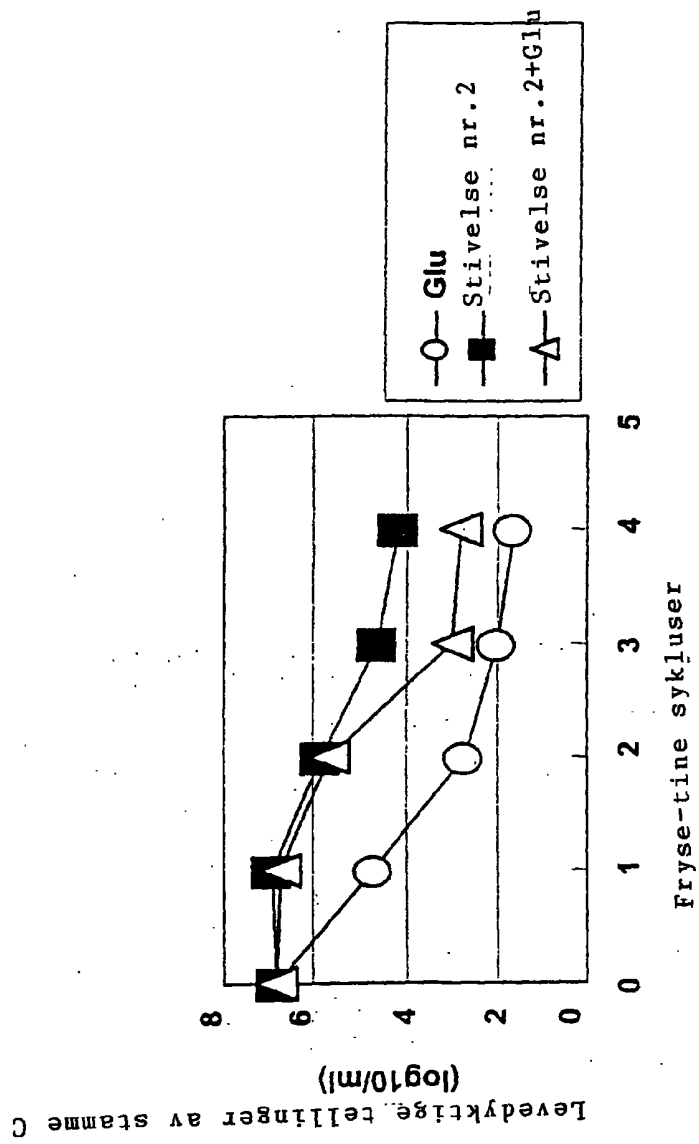
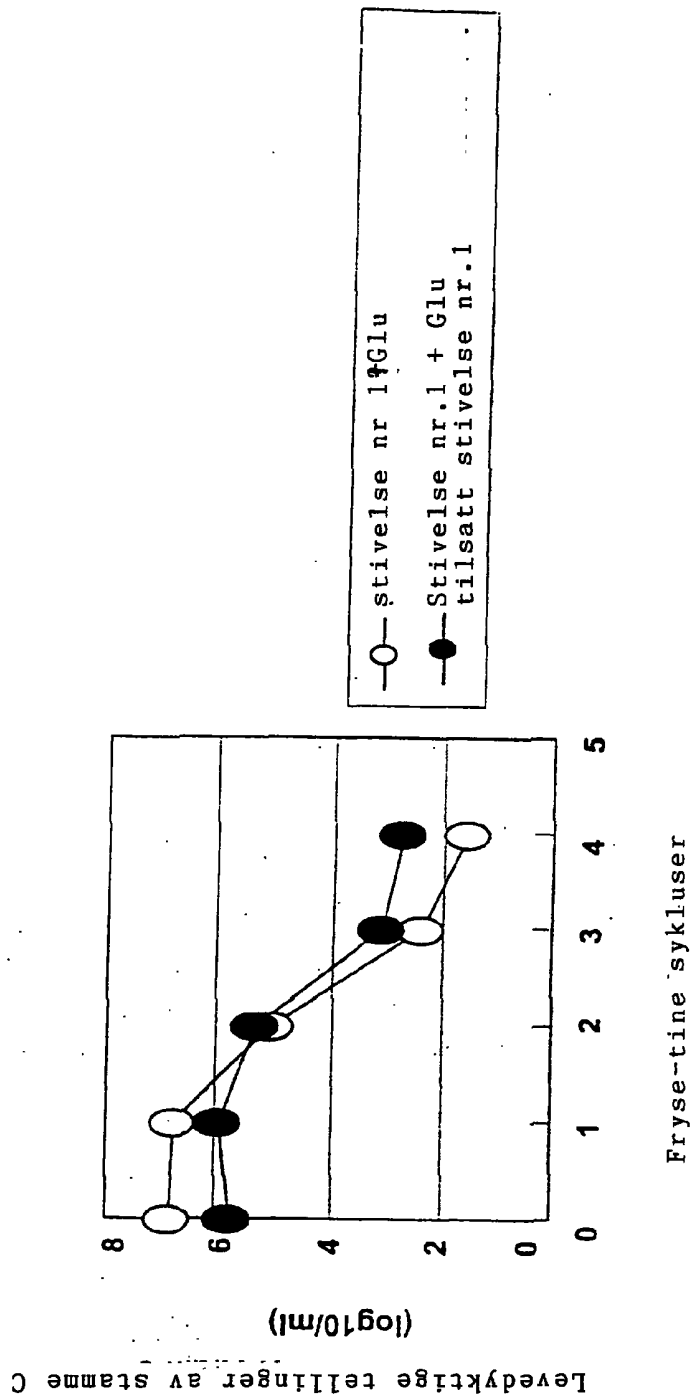
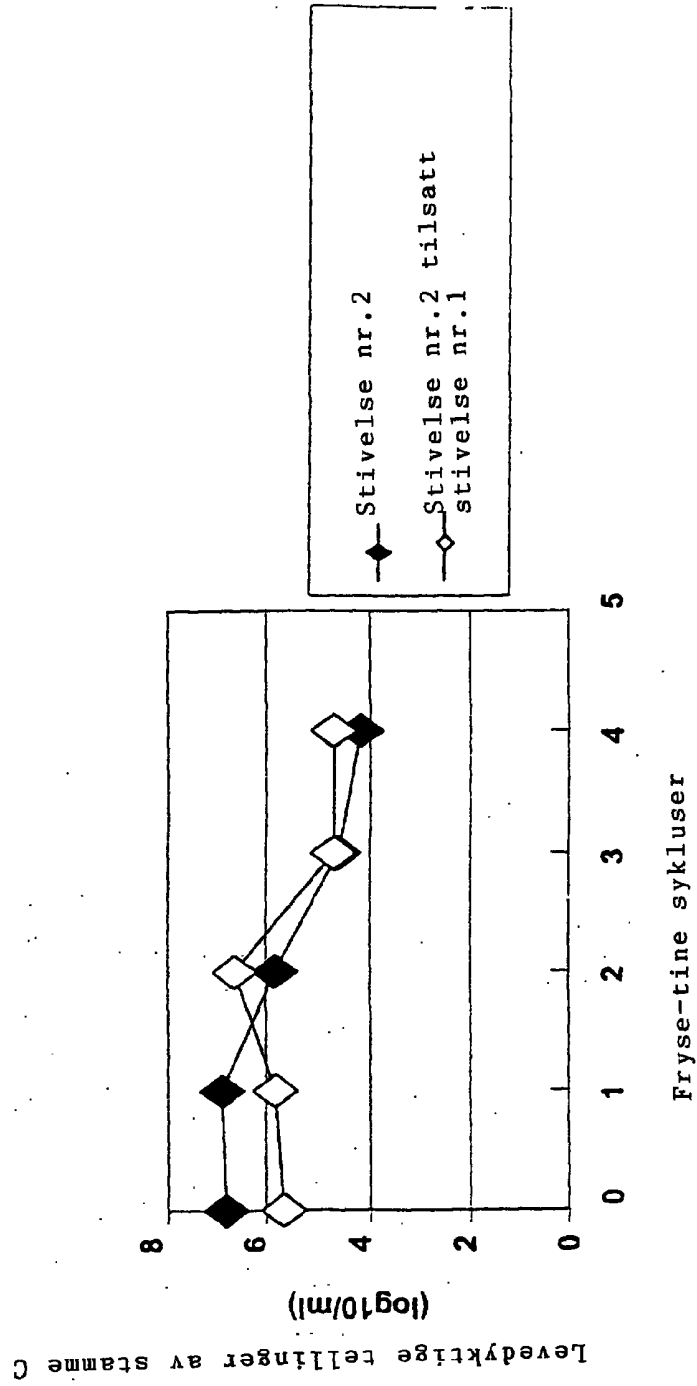


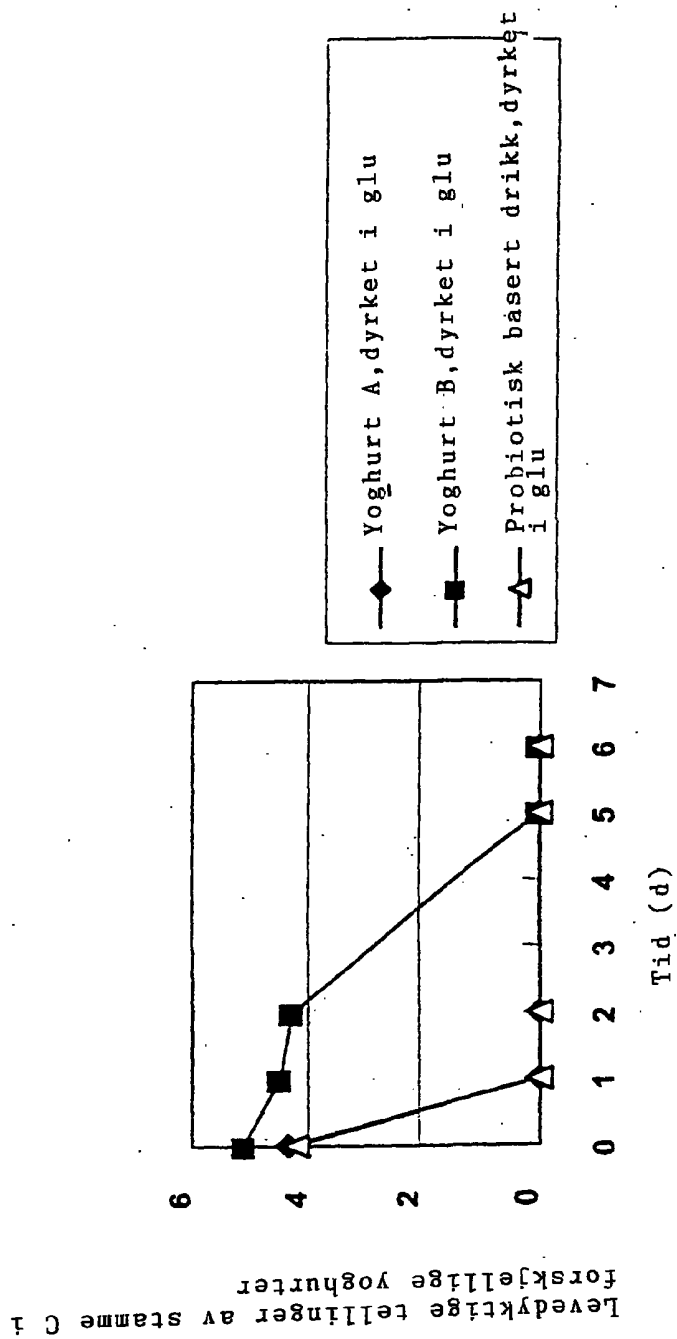
Figure 10



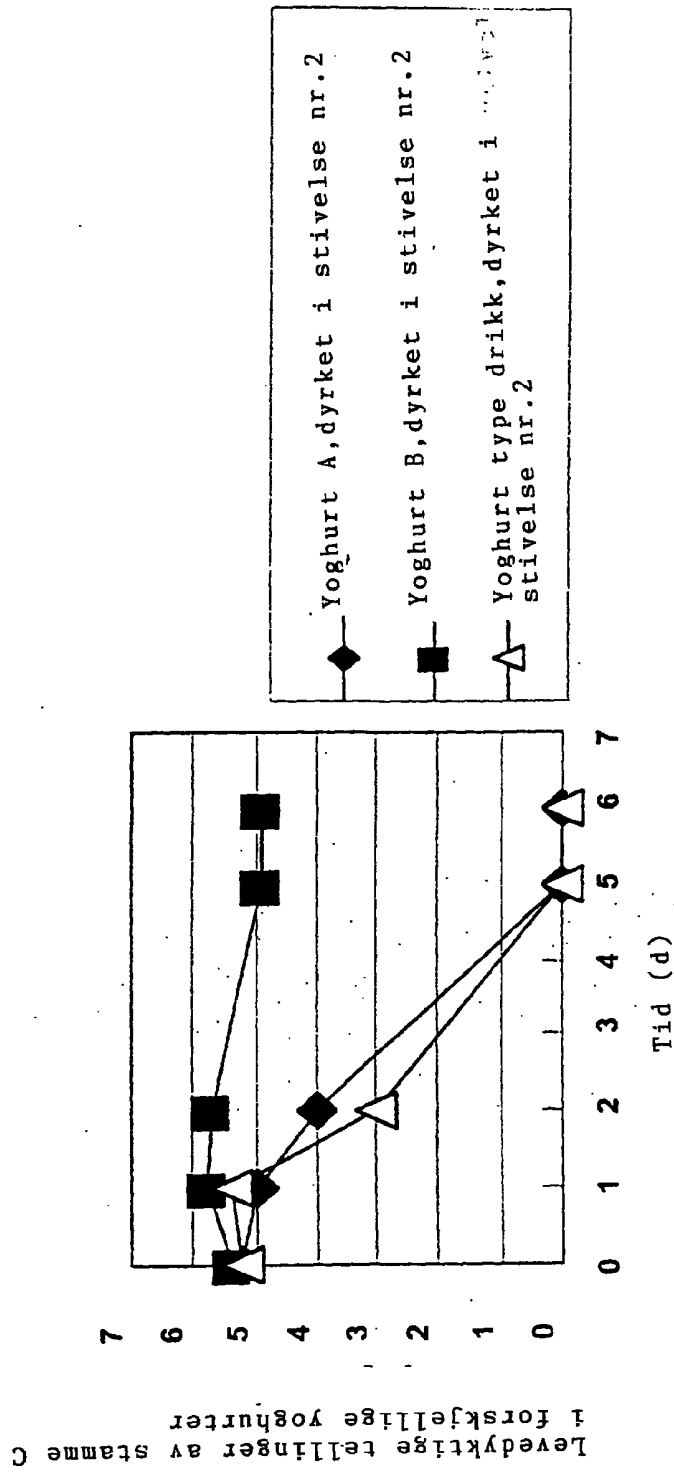
Figur 11



Figur 12



Figur 13



Figur 14