



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108602

(13) C2

(51) МПК

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 07241	(72) Винахідник(и):	Коларов Ладіслав Н.А. (SK), Янковіч Івана (CH), Спренгер Норберт (CH), Шмітт Йєрон Антоніус Йоханнес (CH), Дебеше Такуа (CH)
(22) Дата подання заявки:	09.11.2009	(73) Власник(и):	НЕСТЕК С.А., Avenue Nestle 55, CH-1800 Vevey, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.05.2015	(74) Представник:	Авраменко Наталія Василівна, реєстр. №34
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08168763.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 03/049547 A, 19.06.2003. US 2008/003330 A1, 03.01.2008. US 2008/003329 A1, 03.01.2008. US 2004/202765 A1, 14.10.2004. Wang B et al., The role and potential of sialic acid in human nutrition. European journal of clinical nutrition. - 2003. - Vol. 57, №11, - p. 1351-1369.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	10.11.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.07.2011, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.05.2015, Бюл.№ 10		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2009/064842, 09.11.2009		

## (54) БАКТЕРІЯ, ЩО ВИРОБЛЯЄ СІАЛОВУ КИСЛОТУ

## (57) Реферат:

Винахід належить до харчових бактерій, що виробляють сіалову кислоту, вибраних з групи, до якої входять *Lactobacillus sakei* та *Lactobacillus plantarum*, а також їх застосування для збагачення харчових продуктів сіаловими кислотами.

UA 108602 C2



Даний винахід стосується галузі сіалових кислот, зокрема, галузі харчових продуктів, збагачених сіаловою кислотою, та їх застосування. Один варіант втілення даного винаходу стосується харчового продукту, збагаченого харчовими бактеріями, що виробляють сіалову кислоту, та/або їх фракцією.

5 Сіалові кислоти (SiAc) – це група дев'ятизарядних моносахаридів вуглецю, одержаних з нейрамінової кислоти (NeuAc). NeuAc є єдиною сіаловою кислотою, яка природно виробляється в організмі людини. У інших хребетних також наявні, наприклад, N-гліколілнейрамінові кислоти (NeuGc).

10 SiAc є необхідними для більшості функцій клітин хребетних. Як функціональний та структурний компонент гангліозидів, вони синтезуються в усіх тканинах ссавців. Однак, швидкозростаючі клітин та тканин, що мають високі апоптичні та відновлювальні рівні, можуть потребувати додаткової кількості NeuAc, яку можна одержати, наприклад, шляхом дотримання дієти.

15 Тому, на сьогодні, сіалові кислоти часто застосовуються, зокрема, в області дитячого харчування. Наприклад, Wang узагальнив можливий вплив SiAc на розумовий розвиток немовлят (Wang, B. and Brand-Miller, J. (2003) Eur.J.Clin.Nutr. Nov; 57(11):1351-69). Коротко кажучи, дослідження, в яких проводилося порівняння немовлят, які знаходилися на грудному вигодовуванні та немовлят на вигодовуванні звичайною дитячою сумішшю, демонструють, що  
20 більший вміст NeuAc у грудному молоці порівняно зі звичайною дитячою сумішшю корелює з більшим вмістом NeuAc у слині та мозку немовлят. Однак, додавання NeuAc не виявляє жодних впливів на поведінку людини. Хоча вважають, що збагачення коров'ячого молока NeuAc може надати йому властивостей жіночого молока, яке може мати вплив на розумовий розвиток дитини.

25 Природними джерелами, багатими на SiAc, наприклад, NeuAc, є жіноче молоко, молоко слона, молоко індійського (азіатського) буйвола, м'ясо, яйця та риба. Однак, ці джерела є недостатніми, невідповідними та/або занадто дорогими, наприклад, для збагачення молочних продуктів сіаловою кислотою SiAc у сучасній харчовій промисловості.

Тому, існує велика потреба в альтернативному джерелі SiAc. Автори даного винаходу звернулися до цієї потреби.

30 Тому, метою даного винаходу було одержання винаходу, який забезпечує джерело SiAc, яке є легким у застосуванні на промисловому устаткуванні, є відносно недорогим, та яке дозволяє виділити SiAc у чистому виді або у виді фракції, яку можна застосувати у харчовому продукті.

Автори винаходу несподівано з'ясували, що вони можуть досягти цієї мети шляхом застосування згідно пункту 1 та 10 формули винаходу, та за допомогою харчового продукту,  
35 збагаченого сіаловою кислотою, згідно пункту 9.

Автори винаходу з'ясували, що сіалову кислоту можна легко одержати з бактеріальних джерел у формі, прийнятній для харчових продуктів.

40 SiAc входить до складу оболонки деяких патогенних мікроорганізмів, які виявляють вірулентні впливи. Вважають, що вони функціонують як протирозпізнавальна молекула, яка дозволяє сіалілованим мікроорганізмам маскуватися, уникаючи таким чином імунних механізмів істоти-носія. Однак, сіалова кислота, одержана від патогенних мікроорганізмів, є звичайно неприйнятною для харчових продуктів, зокрема, харчових продуктів для дитячого харчування.

Автори даного винаходу несподівано ідентифікували харчові мікроорганізми, що синтезують SiAc, наприклад, NeuAc, зокрема, коли вони вирощені у стандартному поживному середовищі.

45 Тому, даний винахід стосується сіалової кислоти, яку одержують від харчових бактерій.

Як наслідок, один варіант втілення даного винаходу є застосуванням природних харчових бактерій, які виробляють сіалову кислоту, або принаймні однієї фракції цих бактерій для збагачення харчового продукту сіаловою кислотою.

50 Винахід також стосується застосування сіалової кислоти, одержаної від харчових бактерій, та/або бактеріальних фракцій, які містять сіалову кислоту, для збагачення харчового продукту сіаловою кислотою.

Харчовий продукт може бути збагачений інактивованими або живими харчовими бактеріями, що виробляють сіалову кислоту, та/або фракцією бактерій, та/або поживною культурою.

"Харчові" бактерії – це бактерії, схвалені для споживання людиною або твариною.

55 "Фракція" харчових бактерій, які виробляють сіалову кислоту, є будь-якою частиною бактерій та/або бактеріальної культури, що містить сіалові кислоти. Термін "фракція" харчових бактерій, які виробляють сіалову кислоту, також стосується середовища, де були вирощені харчові бактерії або їх частини, так як це середовище автоматично містить бактеріальну SiAc. Крім цього, термін "фракція" харчових бактерій, які виробляють сіалову кислоту, також стосується

будь-якої фракції, яка містить SiAc, та яку одержали під час виділення SiAc з бактеріальної культури.

У переважному варіанті втілення згідно даного винаходу природні харчові бактерії, які виробляють сіалову кислоту, є життєздатними у харчовому продукті. Перевагою цього є те, що бактерії можуть продовжувати виробляти сіалову кислоту у тілі, навіть після споживання продукту. Більш того, якщо бактерії залишаються життєздатними у тілі, вони розмножуються та, як наслідок, у тілі значно збільшується кількість сіалової кислоти, яку виробляють бактерії.

Для стерильних продуктів також може бути переважним, щоб бактерії були наявні у інактивованій формі, або у випадку, якщо продукт збагачений чистою бактеріальною SiAc або фракцією культури бактерій, які виробляють SiAc, яка не містить жодної живої бактерії.

Зокрема, якщо харчові бактерії є життєздатними у продукті, бактерії або принаймні одна їх фракція буде ефективною у будь-якій кількості. Якщо бактерії досягають кишечника живими, однієї бактерії може бути достатньо для досягнення вагомого ефекту шляхом колонізації та розмноження.

Однак, для харчового продукту згідно даного винаходу зазвичай переважно, якщо бактерії або принаймні одна їх фракція застосовуються у кількості, достатній для збільшення у харчовому продукті вмісту сіалової кислоти до 0,05-2 мас. %, переважно 0,4-1,5 мас. %, переважніше 0,6-1 мас. % в сухій вазі.

Харчовий продукт згідно даного винаходу може бути харчовою композицією, нутрицевтиком, напоєм, харчовою добавкою або лікарським засобом. Харчова добавка або лікарський засіб можуть бути, наприклад, у формі пігулок, капсул, пастилок або рідини.

Харчовий продукт переважно обирають з групи, до якої належать: харчові продукти на основі молока, зокрема, молоко, сироватка, йогурт, сир, ферментовані продукти; дитячі суміші для годування; тверде дитяче харчування; суміші для доросліших дітей; напої для дітей дошкільного віку; фруктові соки, принаймні частково розчинні, суміші для напоїв у формі порошку, такі, як солодові напої, шоколадні напої, капучіно, кавові напої; шоколад; зернові продукти; солодоші; печиво; желе.

Молоком може бути будь-яке молоко, яке одержують від тварин або з рослинних джерел, та переважно це коров'яче молоко, жіноче молоко, молоко вівці, козине молоко, молоко верблюда або соєве молоко.

Замість молока також можна застосовувати білкові фракції, одержані з молока, або молозиво.

Харчовий продукт може додатково містити захисні гідроколлоїди (такі, як камідь, білки, модифіковані крохмалі), зв'язувальні речовини, оболонкоутворюючі речовини, інкапсулюючі агенти/матеріали, оболонкові матеріали, матричні сполуки, покриваючі речовини, емульгатори, поверхнево-активні агенти, солюбілізатори (олії, жири, віск, лецитини та ін.), абсорбенти, носії, наповнювачі, ко-сполуки, диспергатори, змочувальні речовини, допоміжні речовини (розчинники), агенти текучості, речовини, що корегують смак, обважнювачі, желеутворюючі агенти, гелеутворюючі агенти, антиоксиданти та антимікробні речовини. Вони також можуть містити звичайні фармацевтичні добавки та ад'юванти, наповнювачі та розчинники, включаючи, зокрема, але не виключно, воду, желатин будь-якого походження, рослинну камідь, лігнінсульфонат, тальк, цукри, крохмаль, аравійську камідь, рослинні олії, поліалкіленгліколі, ароматизатори, консерванти, стабілізатори, емульгатори, буферні речовини, лубриканти, барвники, змочувачі, наповнювачі і т.п. Додатково, вони можуть містити органічні або неорганічні носії матеріалу, прийнятного для орального або ентерального введення, такі, як вітаміни, мінеральні мікроелементи та інші поживні мікроелементи відповідно до рекомендацій державних органів, таких, як USRDA.

Харчовий продукт згідно даного винаходу може містити джерело білку, джерело вуглеводу та/або джерело ліпиду.

Можна застосовувати будь-який прийнятний харчовий білок, наприклад, тваринні білки (такі, як молочні білки, м'ясні білки та яєчні білки), рослинні білки (такі, як соєвий білок, пшеничний білок, рисовий білок та гороховий білок), суміші вільних амінокислот або їх суміші. Зокрема, переважними молочними білками є казеїн, сироватка та соєві білки.

Якщо харчовий продукт містить джерело жиру, джерело жиру переважніше забезпечує 5-40 % енергії суміші, наприклад, 20-30 % енергії. Можна додати докозагексаєнову кислоту. Застосовуючи суміш олій каноли, кукурудзяної олії та соняшникової олії з високим вмістом олеїнової кислоти, можна досягти бажаного жирового профілю.

Джерело вуглеводів може переважніше забезпечувати 40-80 % енергії суміші. Можна застосовувати будь-який прийнятний вуглевод, наприклад, сахарозу, лактозу, глюкозу, фруктозу, сухі речовини кукурудзяної меласи, мальтодекстрини та їх суміші.

Харчові бактерії переважно обирають з групи, до якої належать лактобактерії.

Автори даного винаходу з'ясували, що лактобактерії виробляють SiAc в особливо великих кількостях, якщо лактобактерії виробляють N-ацетилнейрамінатліazu та/або N-ацетилнейрамінатальдолазу.

Особливо переважними видами лактобактерій, які можуть застосовуватися, виходячи з цілей даного винаходу, є *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* та/або *Lactobacillus salivarius*. Зокрема, гарні результати одержали з бактеріями, обраними з групи, до якої належать *Lactobacillus sakei* NCC 121, *Lactobacillus sakei* NCC 2935, *Lactobacillus sakei* NCC 2934, *Lactobacillus sakei* NCC 166, *Lactobacillus sakei* NCC 170, *Lactobacillus sakei* NCC 1393, *Lactobacillus sakei* NCC 1428, *Lactobacillus sakei* NCC 1511, *Lactobacillus sakei* NCC 2937, *Lactobacillus plantarum* NCC 2936, *Lactobacillus plantarum* NCC 252 або їх суміші.

Виходячи з цілей даного винаходу, можна застосовувати будь-яку бактеріальну фракцію. Зокрема, переважними фракціями є фракції, які одержують шляхом вирощування клітин у поживному середовищі, збору клітин, гідролізу клітин в кислих умовах та збору супернатанта, який містить сілову кислоту.

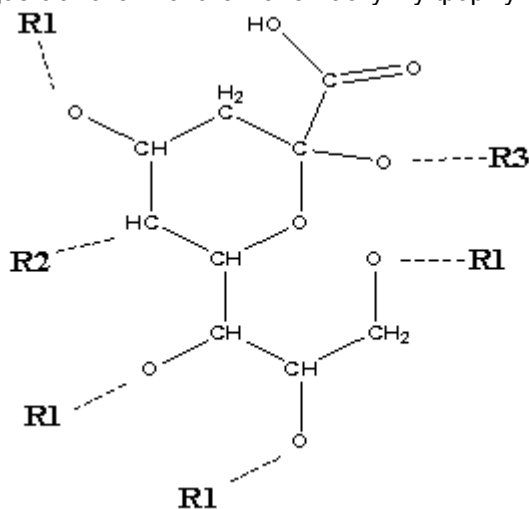
Наприклад, можна застосовувати один з наступних способів:

Спосіб 1: Після 16 годин вирощування при 37 °C у середовищі активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) (1 % пептону, 0,5 % екстракту дріжджів, 0,1 % полісорбату 80, 0,2 % цитрату амонію, 0,5 % ацетату натрію, 0,01 % сульфату магнію, 0,005 % сульфату марганцю, 0,2 % дикаліюфосфату, 1 % глюкози), клітини зібрали та один раз промили водою. Сілові кислоти з клітин виділили шляхом гідролізу протягом 3 годин у 2 моль оцтової кислоти при 80 °C. Супернатант, одержаний після центрифугування, ліофілізували.

Спосіб 2: Клітини вирощували у АФІ середовищі (див. вище) протягом 16 годин при 37 °C. До 1л ферментаційного середовища додали 250г трихлорової кислоти та перемішали протягом 1 години при кімнатній температурі. Після центрифугування клітин до супернатанту додали 1л ацетону та проінкубували за ніч при 4 °C, потім знову відцентрифугували. Преципітат промили 50 % ацетоном та повторно розчинили у воді. Провели корекцію рН до 7 та повторне центрифугування. Екстракт продіалізували через воду та повторно ліофілізували.

Спосіб 3: Після 16-годинного вирощування при 37 °C у АФІ середовищі (див. вище) бактеріальні клітини двічі промили холодним фосфатно-сольовим буферним розчином (137 ммоль NaCl, 2,7 ммоль KCl, 8,1 ммоль Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 ммоль KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) та один раз 0,1 моль ацетатом піридину (pH5). Бактерії повторно розвели у 0,1 об. підігрітого ацетату піримідину (0,1 моль, pH5) та проінкубували при 37 °C протягом 1 години. Супернатант, одержаний після центрифугування, проліофілізували.

Виходячи з цілей даного винаходу, можна застосовувати будь-яку сілову кислоту. Однак, переважно, щоб сілова кислота мала наступну формулу:



R1 = H, ацетил, лактил, метил, сульфат, фосфат, ангідро, сілова кислота, фукоза, глюкоза або галактоза

R2=N-ацетил, N-гліколіл, аміно, гідроксил, N-гліколіл-О-ацетил або N-гліколіл-О-метил

R3= H, галактоза, N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, сілова кислота або N-гліколілнейрамінова кислота

R1 можна обрати з групи, до якої входять H, ацетил, лактил, метил, сульфат, фосфат, ангідро, сілова кислота, фукоза, глюкоза або галактоза.

R2 можна обрати з групи, до якої входять N-ацетил, N-гліколіл, аміно, гідроксил, N-гліколіл-О-ацетил або N-гліколіл-О-метил.

R3 можна обрати з групи, до якої входять Н, галактоза, N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, сіалова кислота або N-гліколілнейрамінова кислота.

5 Групи у позиції R1 можуть бути однаковими або можуть відрізнятися одна від одної. Аналогічно, групи у позиції R2 можуть бути однаковими або відрізняються одна від одної, як і групи у позиції R3.

У особливо переважному варіанті втілення даного винаходу сіаловою кислотою є N-ацетилнейрамінова кислота з R1=H, R2=N-ацетил та R3=H.

10 Даний винахід також стосується харчового продукту, збагаченого сіаловою кислотою, який містить природну сіалову кислоту, що виробляється харчовими бактеріями або їх фракцією. Збагачений сіаловою кислотою харчовий продукт може мати ті ж характеристики, що й описані вище, для застосування згідно даного винаходу.

15 Харчовий продукт збагачений сіаловою кислотою, якщо до нього додали сіалову кислоту або бактерії, які виробляють сіалову кислоту. Наприклад, за допомогою збагачення вміст сіалової кислоти, що природно наявна у харчовому продукті, підвищують принаймні до 10мас. %, переважно до 50 мас. %, навіть переважніше до 100 мас. %.

20 Харчовий продукт згідно даного винаходу можна застосовувати в якості харчування суб'єкта, наприклад, для збалансування дефіциту вироблення ендогенної сіалової кислоти. Зокрема, у зростаючих організмах потреба у сіалових кислотах перевищує власне виробництво ендогенної сіалової кислоти. Тому збагачені сіаловою кислотою продукти харчування можуть сприяти зросту суб'єктів. Однак, дефіцит вироблення ендогенної сіалової кислоти може також спостерігатися у суб'єктів, ріст яких вже припинився.

25 Тому, даний винахід також стосується харчового продукту згідно даного винаходу, який застосовується для забезпечення харчування суб'єкта. Харчовий продукт можна застосовувати для збалансування дефіциту вироблення ендогенної сіалової кислоти.

30 Як наслідок, предмет даного винаходу призначений для людей або тварин, зокрема, свійських тварин, домашніх тварин та/або худоби. Даний винахід, як правило, не обмежується будь-якою конкретною віковою групою. Харчовий продукт можна вводити матерям під час вагітності та лактації для лікування немовляти, для впливу на дитину. Його також можна вводити немовлятам, дітям, підліткам, дорослим або літнім людям. Однак, переважно харчовий продукт вводять немовлятам.

Узагальнення ролі та потенціалу сіалових кислот у годуванні людини було зроблено Wang B. та Brand-Miller. J. (2003) Eur.J.Clin.Nutr. Nov; 57(11):1351-69.

35 Автори даного винаходу нещодавно з'ясували, що введення харчового продукту згідно даного винаходу людині підвищує сіалілування у мозку, зокрема, у літніх людей. Це видно, наприклад, з підвищення сіалілування багатих гангліозидами (сіаліл-лактозилкерамідами) тканин мозку. Сіалілування та особливо гангліозиди є важливими факторами у стабізації нейрональної цілісності та у забезпеченні нейрональної пластичності центральної та периферійної нервової системи.

40 Також було з'ясовано, що введення харчового продукту згідно даного винаходу, переважно літнім людям, підвищує сіалілування у шлунково-кишковому тракті, зокрема, слизовій оболонці проксимального та дистального відділів товстого кишечника. Таким чином, модифікація сіалілування слизового секрету впливає на фізико-хімічні характеристики бар'єру слизової. Крім того, виявили підвищення пов'язаного з гліколіпідом сіалілування, про що свідчить підвищення рівнів гангліозидів у товстому кишечнику.

45 Подальші спостереження показали, що введення суб'єкту харчового продукту згідно даного винаходу покращує клітинно-опосередкований імунітет. Одночасно, у суб'єктів, що споживали харчовий продукт згідно даного винаходу, порівняно з контрольною групою людей, спостерігалось підвищення інтерлейкінів-2 при стимулюванні in-vitro спленоцитів за допомогою лектину ConA. Цей ефект був навіть більш яскраво виражений у немовлят та дітей, ніж у літніх людей.

50 Отже, харчовий продукт згідно даного винаходу та/або сіалова кислота, одержана від харчових бактерій, можуть застосовуватися для лікування або профілактики нейродегенерації, зокрема, у дорослих. Його також можна застосовувати для покращення когнітивної діяльності та/або для сприяння розвитку мозку, зокрема, у дітей.

Додатково харчовий продукт згідно даного винаходу та/або сіалову кислоту, одержану з харчових бактерій, застосовують для зміцнення імунної системи, зокрема, для підвищення імунітету та/або покращення роботи кишечника.

Конкретними клінічними патологіями, які можна лікувати або профілактику яких можна здійснювати за допомогою харчового продукту згідно даного винаходу та/або сілової кислоти, одержаної з харчових бактерій, можуть бути, наприклад, запалення кишечника, синдром подразненого кишечника, дегенеративні патології нервової системи, такі, як деменція або хвороба Альцгеймера, пост-інфекційні аутодеструктивні імунopatологічні захворювання та/або нейронна деградація шлунково-кишкового тракту.

Як наслідок, харчовий продукт згідно даного винаходу та/або сілова кислота, одержана від харчових бактерій, може, наприклад, сприяти здоровому росту та здоровому старінню; підтримувати розумовий розвиток у немовлят та дітей; покращувати когнітивну діяльність; здійснювати профілактику або протидіяти когнітивному спаду та/або нейродегенерації, наприклад, в результаті старіння, хвороби або стресу; сприяти становленню імунної системи та гомеостазу; підвищувати сіалілування, наприклад, у літніх людей, а саме, шляхом введення в раціон NeuAc для імунного захисту, для зниження випадків неспецифічних запалень, для покращення захисного бар'єру кишечника та/або для пригнічення систематичних запалень.

Збагачений сіловою кислотою харчовий продукт згідно даного винаходу може сприяти оптимальному надходженню SiAc в організм новонародженого, наприклад, з материнським молоком або дитячими сумішами для годування; сприяти нормальному розвитку ЦНС, відновлюванню істотного дефіциту SiAc, наприклад, під час вагітності, в період лактації та/або у випадках недостатнього харчування.

Фахівці з рівня техніки розуміють, що вони можуть поєднувати усі описані наразі характеристики даного винаходу, не виходячи за межі обсягу винаходу. Зокрема, характеристики, описані для застосування згідно даного винаходу, можна застосовувати до харчового продукту згідно даного винаходу і навпаки.

Додаткові переваги та характеристики даного винаходу висвітлені за допомогою наступних прикладів та креслень.

На фігурі 1 зображено хроматограми 1,2-Діаміно-4,5-метилендиоксибензен дихлоргідрату (ДМБ): *L. plantarum* NCC2936 (A); NCC2936 з додаванням NeuAC та NeuGc стандартна (B); та NeuAC і NeuGc стандартна (C).

Приклади:

Способи

Штами бактерій та їх вироблення

Штами бактерій одержали з колекції культур Nestle та виростили в АФІ середовищі (1 % пептону, 0,5 % екстракту дріжджів, 0,1 % полісорбату 80, 0,2 % цитрату амонію, 0,5 % ацетату натрію, 0,01 % сульфату магнію, 0,005 % сульфату марганцю, 0,2 % дикаліюфосфату та 1 % глюкози). Після вирощування протягом 16 годин при 30 °C бактерії зібрали та сублімували.

Виявлення SiAc

Наявність SiAc визначили із застосуванням модифікованого способу Jourdian et al. (1971) J Biol Chem 246: 430-435. Коротко кажучи, 10 мкл 0,04 моль йодної кислоти змішали з 50 мкл зразку або 50 мкл NeuAC стандартна (0, 20, 40, 60 та 100 мкг/мл) та проінкубували протягом 35 хвилин на льодяній бані. 125 мкл свіжої суміші, до складу якої входить 0,04 мг  $\text{CuSO}_4$ , додали у 6 мл 28 %  $\text{HCl}$ +1мл 6 % +резорцину+3 мл  $\text{H}_2\text{O}$  та проінкубували протягом 5 хвилин при 4 °C. Зразки прокип'ятили протягом 15 хвилин та охолодили. Додали 125 мкл 95 % трет-бутанолу та проінкубували протягом 3 хвилин при 37 °C для стабілізації кольору. Було проведено візуальну оцінку шляхом порівняння зразків за насиченістю синього кольору зі стандартами різних концентрацій.

Кількісний аналіз SiAc

Спосіб 1,2-Діаміно-4,5-метилендиоксибензен дихлоргідрату (ДМБ): Бактеріальний зразок розчинили у воді для одержання очікуваної загальної концентрації сілової кислоти приблизно 2 мкг/мл. 200 мкл (аліквота) даного розчину гідролізували шляхом додавання 200 мкл мурашиної кислоти (1.0 моль) та нагрівання при 80 °C протягом 2 годин для виділення усіх зв'язаних сілових кислот. Потім сілові кислоти дериватизували із 1,2-діаміно-4,5-метилендиоксибензен дихлоргідрату (ДМБ), флуоресцентна позначка характерна для  $\alpha$ -кетокислот. Дериватизацію здійснили шляхом додавання 200 мкл розчину ДМБ (7.0 ммоль у 1.4 моль оцтової кислоти, яка містить 0,75 моль 2-меркаптоетанолу та 18 ммоль гідросульфату натрію) до 200 мкл (аліквота) гідролізованого зразку, потім суміш нагріли до 80 °C протягом 50 хвилин. Дериватизовані зразки (5 мкл) інжектували на колонку обернено-фазної вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) (Zorbax SB-Aq, 3.5 мкм, 4,6-50 мм) та проілюювали із застосуванням рухомої фази води /метанолу/ оцтової кислоти (75/25/0,05<sub>(об/об/об)</sub>) при швидкості 2,0 мл/хв. Моніторинг колонки розчинника здійснювали за допомогою флуоресцентного визначення ( $\lambda_{\text{ex}}$ =373 нм,  $\lambda_{\text{em}}$ =448 нм).

Кількісний аналіз здійснили за допомогою градувального графіку, на якому порівняли сілову кислоту відомої концентрації з піковими значеннями зразків стандартних кислот.

Ідентифікація NeuAc (аналіз методом газової хроматографії та мас-спектрометрії (ГХ-МС)

Метилглікозиди приготували із дозованої кількості зразку шляхом обробки 1 моль HCl у метанолі (25 крапель) при 80 °C протягом 15 годин, після ре-N-ацетилювання за допомогою піридину (5 крапель) та оцтового ангідриду (5 крапель) у метанолі (20 крапель) при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім зразки піддали пер-О-триметилсіалілуванню шляхом обробки за допомогою Tri-Sil (10 крапель, Pierce) при 80 °C (15 хвилин). Дані дослідження здійснювалися, як це було описано вище (Merkle, R. K. and I. Poppe (1994) *Methods Enzymol.* 230:1-15; York, W.A. et al (1986) *Methods Enzymol.* 118:3-40). Аналіз методом газової хроматографії та мас-спектрометрії TMS метилглікозидів здійснили на HP 5890 GC з'єднаного з 5970 MSD, із застосуванням DB-1 колонки (30м × 0.25 мм ID).

Результати

Виявлення бактерій, що виробляють SiAc

Бактерії з колекції культур Nestle піддали екрануванню на вироблення SiAc із застосуванням періодичного способу. Наступні штами визнали особливо ефективними у виробленні SiAc, і були задепозитовані за Будапештською угодою.

Lactobacillus sakei NCC 121 (номер депозиту CNCM I-4020)  
Lactobacillus sakei NCC 2935 (номер депозиту CNCM I-4064)  
Lactobacillus sakei NCC 2934 (номер депозиту CNCM I-4025)  
Lactobacillus sakei NCC 166 (номер депозиту CNCM I-4066)  
Lactobacillus sakei NCC 170 (номер депозиту CNCM I-4067)  
Lactobacillus sakei NCC 1393 (номер депозиту CNCM I-4022)  
Lactobacillus sakei NCC 1428 (номер депозиту CNCM I-4023)  
Lactobacillus sakei NCC 1511 (номер депозиту CNCM I-4024)  
Lactobacillus sakei NCC 2937 (номер депозиту CNCM I-4065)  
Lactobacillus plantarum NCC 2936 (номер депозиту CNCM I-4026)  
Lactobacillus plantarum NCC 252 (номер депозиту CNCM I-4021)

Ідентифікація типу SiAc

Висушені порошки штамів, що виробляють SiAc, приготували, як це описано у розділах Матеріал та Способи. Одні й ті ж порошки проаналізували із застосуванням двох різних способів ДМБ та ГХ-МС:

а) На фігурі 1 зображено звичайну хроматограму проаналізованих штамів (NCC 2936), одержану із застосуванням способу ДМБ. Застосовуючи цей спосіб, було виявлено піки, які виникали майже одночасно із утриманням N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc), але з деяким зсувом часу утримання. Не було виявлено жодного очевидного піку близького до N-гліколілнейрамінової кислоти (NeuGc). Такий зсув може траплятися, якщо зразок містить дещо, що приєднується до стаціонарної фази колонки. Приєднання зменшує взаємодію аналізованої речовини зі стаціонарною фазою, і тому виникає зсув у часі утримання. Альтернативно, SiAc можна модифікувати за допомогою додаткової хімічної групи, що впливає на зміну часу утримання.

Щоб визначити, чи відбувся зсув піків за рахунок взаємодіючих сполук у зразку, було проведено експеримент "додавання". Визначену кількість NeuAc стандартна додали до однієї порції зразку, та зразок прогнали знову на ВЕРХ. Час утримання піку, який спостерігається у введеному зразку, був набагато ближче до часу утримання піку NeuAc стандартна, можливо завдяки ефекту розбавлення. Було зафіксовано тільки один пік у введеному зразку NeuAc, що свідчить про те, що стандартна кислота, введена до зразка, співпадає у єдиній позиції з піком початкового зразка. Тому, можна зробити висновок, що цей пік більш ймовірно є піком NeuAc та, що зафіксований спочатку зсув часу утримання стався за рахунок взаємодіючих сполук у зразку, а не за рахунок модифікації NeuAc.

б) ще один доказ того, що бактерії виробляють NeuAc, одержали за допомогою ГХ-МС аналізу. Застосовуючи цей спосіб, дослідили глікозильну композицію бактеріальних зразків (Табл. 1). В результаті було доведено, що SiAc, наявна в бактеріальних зразках, є NeuAc.

Таблиця 1: Дослідження глікозильної композиції бактеріальних зразків

Зразок	Глікозильний залишок	Маса (мкг)	моль % <sup>1</sup>
<i>L. sakei</i>	Рибоза (Rib)	4.0	4.3
NCC 2934	Галактоза (Gal)	23.2	20.7
	Глюкоза (Glc)	42.8	38.3
	N-ацетилглюкозамін (GlcNAc)	40.2	36.0
	N-ацетилнейрамінова кислота (NANA) <u>1.5</u>		0.7
	$\Sigma=111.7$		
<i>L. sakei</i>	Рибоза (Rib)	1.8	6.4
NCC 2935	Галактоза (Gal)	1.7	4.9
	Глюкоза (Glc)	16.9	49.8
	N-ацетилглюкозамін (GlcNAc)	12.8	37.8
	N-ацетилнейрамінова кислота (NANA) <u>0.6</u>		1.1
	$\Sigma=33.8$		
<i>L. sakei</i>	Рибоза (Rib)	1.8	6.2
NCC 2937	Рамноза (Rha)	4.7	14.6
	Галактоза (Gal)	1.4	4.1
	Глюкоза (Glc)	9.7	27.3
	N-ацетилглюкозамін (GlcNAc)	16.4	46.4
	N-ацетилнейрамінова кислота (NANA) <u>0.6</u>		1.4
	$\Sigma=34.6$		
<i>L. plantarum</i>	Рибоза (Rib)	3.9	5.3
NCC 2936	Галактоза (Gal)	5.9	6.8
	Глюкоза (Glc)	56.4	64.8
	N-ацетилглюкозамін (GlcNAc)	18.2	21.0
N-ацетилнейрамінова кислота (NANA) <u>2.3</u>			2.1
		$\Sigma=86.7$	

<sup>1</sup> Значення виражені у % моль від загального вмісту вуглеводу.

#### Кількісний аналіз SiAc

- 5 Кількісний аналіз SiAc у бактеріальних зразках здійснили за допомогою способу ДМБ та періодичного способу визначення кількісного складу. ДМБ є кількісним методом, в той час як періодичний спосіб є напівкількісним методом дослідження зразків. Застосовуючи періодичний спосіб, не вдалося одержати точне кількісне значення, через високий ступінь фонових кольору, який заважає спектрофотометричному зчитуванню результатів. Результати кількісного дослідження однієї й тієї ж групи бактерій приведено у таблиці 2:
- 10

Таблиця 2:

#### Вміст NeuAc у бактеріальних зразках

Штам	Спосіб ДМБ	Періодичний спосіб
<i>L. sakei</i> NCC2934	0.16	0.27
<i>L. sakei</i> NCC2935	0.13	0.21
<i>L. sakei</i> NCC2937	0.14	0.21
<i>L. plantarum</i> NCC 2936	0.16	0.21

Вміст SiAc виражено у % до бактерій в сухій вазі.

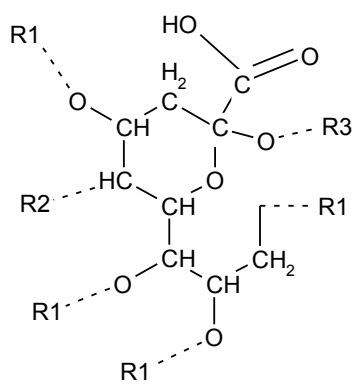
## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування природних харчових бактерій, що виробляють сіалову кислоту, вибраних з групи лактобактерій, зокрема лактобактерій, що виробляють N-ацетилнейрамінатліазу та/або N-ацетилнейрамінаталдолазу, навіть переважніше *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, а саме *Lactobacillus sakei* CNCM I-4064, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4025, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4065, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4026, або їх суміші, для збагачення харчового продукту сіаловою кислотою.

2. Застосування відповідно до п. 1, яке **відрізняється** тим, що природні харчові бактерії, що виробляють сіалову кислоту, є життєздатними, і тому вони виробляють сіалову кислоту в організмі після споживання харчового продукту.

3. Застосування відповідно до п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що бактерії застосовують у необхідній кількості для підвищення вмісту сіалової кислоти у харчовому продукті до 0,05-2 мас. %, переважно 0,4-1,5 мас. %, переважніше 0,6-1 мас. % в сухій вазі.

4. Застосування відповідно до пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що сіалова кислота має наступну формулу:



де

R1 = H, ацетил, лактил, метил, сульфат, фосфат, ангідро, сіалова кислота, фукоза, глюкоза або галактоза,

R2 = N-ацетил, N-гліколіл, аміно, гідроксил, N-гліколіл-О-ацетил або N-гліколіл-О-метил,

R3 = H, галактоза, N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, сіалова кислота або N-гліколілнейрамінова кислота та переважніше є N-ацетилнейраміновою кислотою (R1 = H, R2 = N-ацетил, R3 = H).

5. Застосування за пп. 1-4, в якому харчовий продукт вибирають з групи, до якої належать харчові продукти на основі молока, зокрема молоко, сироватка, йогурт, сир, ферментовані продукти; дитячі суміші для годування, тверде дитяче харчування, суміші для доросліших дітей, напої для дітей дошкільного віку, фруктові соки, принаймні частково розчинні, суміші для напоїв у формі порошку, такі як солодові напої, шоколадні напої, капучино, кавові напої, шоколад, зернові продукти, солодоші, печиво, желе.

6. Харчовий продукт, збагачений сіаловою кислотою, що включає природні харчові бактерії, що виробляють сіалову кислоту, вибрані з групи, до якої входять *Lactobacillus sakei* CNCM I-4064, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4025, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4065, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4026.

7. Харчовий продукт, збагачений сіаловою кислотою, відповідно до п. 6, який застосовують для збалансування дефіциту вироблення ендогенної сіалової кислоти.

8. Харчовий продукт, збагачений сіаловою кислотою, відповідно до п. 6, який застосовують під час лікування або профілактики нейродегенерації, зокрема, у дорослих.

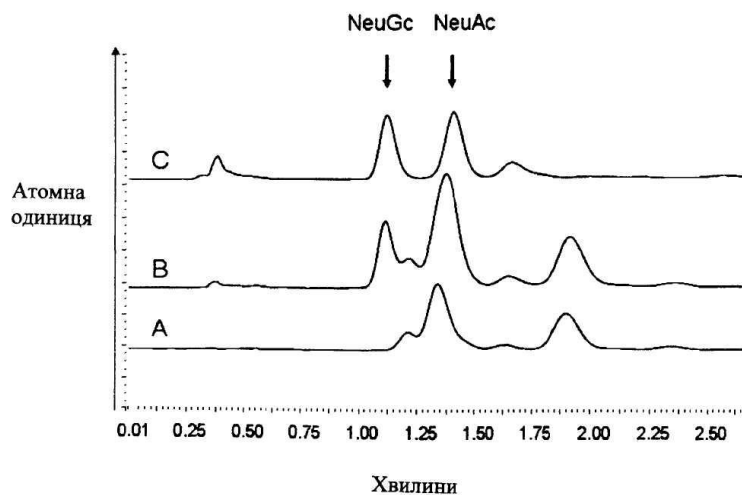
9. Харчовий продукт, збагачений сіаловою кислотою, відповідно до п. 6, який застосовують для зміцнення імунної системи, зокрема для підвищення імунітету та/або покращення роботи кишечника.

10. Харчовий продукт, збагачений сіаловою кислотою, відповідно до п. 6, який застосовують для покращення когнітивної діяльності та/або сприяння розумовому розвитку, зокрема, у дітей.

11. Харчова бактерія, що виробляє сіалову кислоту, вибрана з групи, до якої входять *Lactobacillus sakei* CNCM I-4064, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4025, *Lactobacillus sakei* CNCM I-4065, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4026.

**БАКТЕРІЇ, ЩО ВИРОБЛЯЮТЬ СІАЛОВУ КИСЛОТУ**

Фігура: ВЕРХ-флуоресцентні залишки NCC2936 (A); NCC2936 з додаванням NeuAc і NeuGc стандартна (B); та NeuAc і NeuGc стандартна (C).



**Фіг. 1**

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601