

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034017**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.19

(51) Int. Cl. *A61K 35/742* (2015.01)

(21) Номер заявки
201692563

(22) Дата подачи заявки
2015.08.29

**(54) СПОСОБЫ, ОСНОВАННЫЕ НА КУЛЬТИВИРОВАНИИ BACILLUS COAGULANS
MTCC 5856 В ПРИСУТСТВИИ ПРИРОДНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОЛОКОН**

(31) 62/043,599; 62/063,453

(32) 2014.08.29; 2014.10.14

(33) US

(43) 2017.07.31

(86) PCT/US2015/047608

(87) WO 2016/033572 2016.03.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МАДЖИД МУХАММЕД (US)

(72) Изобретатель:
**Маджид Мухаммед (US), Арумугам
Сивакумар, Али Фуркан (IN)**

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)

(56) US-A1-20120251512

"NCT02176889: A parallel study evaluating the safety of Lactospore in healthy individuals", National Library of Medicine, 26 June 2014 (26.06.2014). Retrieved from the Internet: <https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02176889/2014_06_26> on 16 October 2015 (16.10.2015), entire document

US-A1-20030031659

US-A1-20100172887

US-A1-20100203025

(57) Изобретение относится к способу увеличения количества жизнеспособных колоний *Bacillus coagulans* MTCC 5856, согласно которому культивируют *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lyсium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква). Способ обеспечивает эффективную стимуляцию роста бактерий-пробиотиков *Bacillus coagulans* MTCC 5856. Кроме того, предложен способ ингибирования *E. coli* и способ получения короткоцепочечных жирных кислот, в которых используется вышеуказанная комбинация природных растительных волокон и *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

B1

034017

034017

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка представляет собой подачу согласно РСТ первоначальных заявок США 62043599 и 62063453, поданных 29 августа 2014 г. и 14 октября 2014 г. соответственно.

Предшествующий уровень техники

Область техники

Изобретение в общем относится к *Bacillus coagulans* (молочнокислые бактерии). Более конкретно, изобретение относится к (i) стимулирующей рост активности природных растительных волокон в отношении *Bacillus coagulans* MTCC 5856; (ii) образованию короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) при помощи *Bacillus coagulans* MTCC 5856 с использованием природных растительных волокон и (iii) комбинации природных растительных волокон и *Bacillus coagulans* MTCC 5856 для ингибирования грамотрицательных патогенных бактерий.

Описание предшествующего уровня техники

В данной области хорошо известно объединение полиштаммовых пробиотиков (бактерий-пробиотиков) и пребиотиков для достижения усиленных иммуноподдерживающих эффектов. Конкретно, сообщается об объединении пробиотиков с природными растительными волокнами с получением синбиотиков в качестве перспективного терапевтического подхода (Stig Bengmark и Robert Martindale, "Prebiotics and Synbiotics in Clinical Medicine", *Nutr Clin Pract* т. 20, 244-261, апрель 2005). Успех такого подхода зависит от тщательного выбора конкретных микроорганизмов-пробиотиков, количество жизнеспособных единиц которых эффективно возрастает при помощи природных растительных волокон, которые устойчивы как к ферментативному, так и кислотному гидролизу в кишечнике. Данные исследования крайне важны для обеспечения указанного эффекта у животных-хозяев, которых подвергают воздействию режимов питания, включающих синбиотики, принимая во внимание то, что существуют ограничения в отношении расщепления и использования волокон микробами с учетом доступности субстратов микроорганизмам, физической и химической природы волокон (фураж), а также кинетики пищеварительного процесса (Gabriella A. Varga и Eric S. Kolver, "Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization", *J. Nutr.*, 1 мая, 1997, т. 127, № 5, 819S-823S).

Основная цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы оценить эффект выбранных природных волокон (устойчивых к ферментативному и кислотному гидролизу) в отношении увеличения количества жизнеспособных *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

Также другая цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы оценить способность синбиотической композиции (природных волокон и *Bacillus coagulans* MTCC 5856) ингибировать грамотрицательные патогенные бактерии.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы оценить способность синбиотической композиции (природных волокон и *Bacillus coagulans* MTCC 5856) образовывать желательные короткоцепочечные жирные кислоты, причем указанное свойство имеет значительные терапевтические применения.

Согласно настоящему изобретению достигают указанных выше целей и обеспечивают дополнительные связанные с ними преимущества.

Краткое описание изобретения

Описаны (i) стимулирующая рост активность природных растительных волокон в отношении *Bacillus coagulans* MTCC 5856; (ii) комбинация природных растительных волокон и *Bacillus coagulans* MTCC 5856 для ингибирования грамотрицательных патогенных бактерий и (iii) образование короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) *Bacillus coagulans* MTCC 5856 с использованием природных растительных волокон.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего более подробного описания в совокупности с прилагаемыми графическими материалами, которые иллюстрируют в качестве примера принцип изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1а-1в показано графическое представление увеличения количества жизнеспособных колоний *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии разных природных растительных волокон (мас./об.%), взятых отдельно.

На фиг. 2а-2в показано графическое представление увеличения количества жизнеспособных колоний *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии разных природных растительных волокон (мас./об.%) в средах MRS (не содержащих декстрозу) (0,5, 1,0, 2,0 мас./об.%).

Фиг. 3 представляет собой графическое представление ингибирования роста *E. coli* ATCC 25922 при помощи *B. coagulans* MTCC 5856 при сокультивировании в растительных волокнах в качестве сред. Средние значения количества жизнеспособных микроорганизмов выражены в \log_{10} КОЕ (колониеобразующие единицы)/мл.

На фиг. 4 показано образование общего количества короткоцепочечных жирных кислот (ацетат, бутират и пропионат) при помощи *B. coagulans* MTCC 5856 из волокон семян пажитника (FSF), волокон семян *Lyxium barbarum* (LSF), волокон семян льна (FLSF), волокон кокоса (CF), волокон корневища имбиря (GRF), волокон плодов амлы (растворимых + нерастворимых) (AFF), растворимых волокон амлы

(ASF), нерастворимых волокон амлы (AIF), волокон оболочек семян подорожника (PHF), волокон семян клюквы (CSF), фруктоолигосахарида (FOS), сред MRS (MRS) и сред MRS, не содержащих декстрозу (MRSD). Средние значения SCFA выражены в мг на 1 г волокна.

Описание наиболее предпочтительных воплощений

В наиболее предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу увеличения количества жизнеспособных колоний *Bacillus coagulans* MTCC 5856, согласно которому культивируют *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lycium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).

В другом наиболее предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу ингибирования патогенных грамотрицательных бактерий *E. coli*, согласно которому указанные бактерии приводят в контакт с *Bacillus coagulans* MTCC 5856 и сокультивируют в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lycium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).

В еще одном наиболее предпочтительном воплощении настоящее изобретение также относится к способу получения короткоцепочечных жирных кислот, согласно которому культивируют *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lycium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).

В конкретных примерах, включенных в данный документ, ниже проиллюстрированы указанные выше наиболее предпочтительные воплощения настоящего изобретения.

Пример 1. Способ получения волокон.

Волокна семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник).

Семена *Trigonella foenum-graecum* (также известного как пажитник) брали на местном рынке и перемалывали с получением крупного порошка (проходимость через сито 10 меш). Далее, четыре объема н-гексана добавляли к 100 г крупного порошка из семян *Trigonella foenum-graecum* и экстрагировали при температуре дефлегмации. Фракцию н-гексана фильтровали через фильтр Ватмана № 1 и такую же экстракцию проводили еще три раза. После экстракции ретентат сушили при 80°C в течение 5 ч, затем данный ретентат перемалывали с получением порошка с проходимостью через сито 40 меш. В альтернативном способе жир или масло из семян пажитника удаляли способом сверхкритической флюидной экстракции с использованием жидкого CO₂ в качестве растворителя. Для повышения содержания пищевых волокон (галактоманнанов) проводили ферментативный гидролиз с использованием целлюлазы. Содержание галактоманнанов определяли при помощи набора Megazyme (K-GALM 03/11) согласно инструкциям производителя (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ирландия).

Волокна семян *Lycium barbarum*.

Годжи, ягода Годжи или волчья ягода представляет собой плод *Lycium barbarum*. Плод *Lycium barbarum* сушили, семена отделяли и перемалывали с получением крупного порошка. Далее, четыре объема н-гексана добавляли к 100 г крупного порошка *Lycium barbarum* и экстрагировали при температуре дефлегмации. Фракцию н-гексана фильтровали через фильтр Ватмана № 1 и такую же экстракцию проводили еще три раза. После экстракции ретентат сушили при 80°C в течение 5 ч, затем данный ретентат перемалывали с получением порошка с проходимостью через сито 60 меш. Общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

Волокна *Linum usitatissimum* (семя льна).

Семена *Linum usitatissimum* (также известного как лен обыкновенный или льняное семя, или лен) брали и перемалывали с получением крупного порошка (проходимость через сито 10 меш). Далее, четыре объема н-гексана добавляли к 100 г крупного порошка из *Linum usitatissimum* и экстрагировали при температуре дефлегмации. Фракцию н-гексана фильтровали через фильтр Ватмана № 1 и такую же экстракцию проводили еще три раза. После экстракции ретентат сушили при 80°C в течение 5 ч, затем данный ретентат перемалывали с получением порошка с проходимостью через сито 40 меш. Общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

Волокна *Cocos nucifera*.

Созревший кокос брали на местном рынке и сушили. Далее, эндосперм (мякоть кокоса) рубили с получением однородного материала грубого помола. Далее, четыре объема н-гексана добавляли к 100 г материала грубого помола *Cocos nucifera* и экстрагировали при температуре дефлегмации. Фракцию н-гексана фильтровали через фильтр Ватмана № 1 и такую же экстракцию проводили еще три раза. После экстракции ретентат сушили при 80°C в течение 5 ч, затем данный ретентат перемалывали с получением

порошка с проходимостью через сито 60 меш. Общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

Волокна корневища *Zingiber officinale* (имбирь).

Корневище *Zingiber officinale*, корень имбиря или просто имбирь сушили и перемалывали с получением крупного порошка (проходимость через сито 10 меш). Далее, четыре объема н-гексана добавляли к 100 г крупного порошка корневища *Zingiber officinale* и экстрагировали при температуре дефлегмации. Фракцию н-гексана фильтровали через фильтр Ватмана № 1 и такую же экстракцию проводили еще три раза. В альтернативном способе жир или масло из семян пажитника удаляли способом сверхкритической флюидной экстракции с использованием жидкого CO₂ в качестве растворителя. После экстракции ретентат сушили при 80°C в течение 5 ч, затем данный ретентат перемалывали с получением порошка с проходимостью через сито 40 меш. Общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

Волокна плодов *Embllica officinalis* (амла).

Embllica officinalis (*Phyllanthus emblica*), также известное как эмблик, миробалан серый, миробалан, индийский крыжовник, молодильное дерево или амла от санскр. *amalika*. Плод *Embllica officinalis* брали на местном рынке и сушили, измельчали и пропускали через сито 60 меш. Данный порошок использовали для экстракции волокон. Общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

Пример 2. Кислотный гидролиз.

2 г растительных природных волокон, перечисленных в табл. 1, растворяли в 100 мл HCl (0,10 М) и инкубировали при 37°C при 100 об/мин в течение 180 мин. Образцы отбирали в 0, 30, 60, 90, 120 и 180 мин. Фруктоолигосахарид (FOS; Tata Chemicals, Индия) также брали в исследовании в качестве эталона для сравнения с природными волокнами и крахмал (растворимый крахмал картофеля; HiMedia, Мумбаи, Индия) также брали в качестве контроля. Увеличение содержания восстанавливающих углеводов измеряли при помощи реагента на основе динитросалицилата (Nilsson и Bjorck 1988. *Journal of Nutrition* 118, 1482-1486).

Таблица 1

Общее содержание пищевых волокон растительных природных волокон

№	Природные волокна	Пищевые волокна (масс./масс.%)		
		Растворимые волокна	Нерастворимые волокна	Общее содержание
1	Волокна семян <i>Trigonella foenum-graecum</i> (пажитник)	65,42 ± 1,2	5,41 ± 0,4	75,24 ± 1,2
2	Волокна семян <i>Lycium barbarum</i>	Н.О.	38,05 ± 0,9	39,71 ± 1,1
3	Волокна семян <i>Linum usitatissimum</i> (лен)	34,68 ± 0,4	12,73 ± 0,1	50,21 ± 1,5
4	Волокна <i>Cocos nucifera</i> (кокос)	33,16 ± 0,7	36,16 ± 0,2	65,41 ± 1,7
5	Волокна корневища <i>Zingiber officinale</i> (имбирь)	Н.О.	41,55 ± 0,7	42,18 ± 0,8
6	Волокна плодов <i>Embllica officinalis</i> (амла)	10,15 ± 0,2	41,58 ± 0,5	52,07 ± 1,4
	- Растворимая фракция	19,04 ± 0,5	1,527 ± 0,1	22,29 ± 0,4
	- Нерастворимая фракция	27,05 ± 0,7	3,55 ± 0,1	33,03 ± 0,7
7	Волокна <i>Plantago ovata</i> (подорожник)	51,13 ± 0,8	30,24 ± 0,8	83,24 ± 1,5
8	Волокна семян <i>Vaccinium oxycoccos</i> (клюква)	10,21 ± 0,6	39,81 ± 0,7	51,92 ± 1,3

Н.О. - не определяли; общее содержание пищевых волокон определяли ферментативно-гравиметрическим методом (АОАС 985.29).

В табл. 2 показан эффект кислотного гидролиза (0,1 М HCl; 37°C, 100 об/мин), оказываемый на растительные природные волокна. Общее содержание восстанавливающих сахаров определяли способом на основе динитросалициловой кислоты (DNSA).

Таблица 2

№	Растительные природные волокна	Общее содержание восстанавливающих сахаров, выраженное в процентах					
		0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	180 мин
1	Волокна семян пажитника	3,79±0,1	3,90±0,1	3,95±0,09	3,33±0,1	4,22±0,2	4,45±0,1
2	Волокна семян Lucium barbarum	11,91±0,2	12,05±0,2	12,98±0,3	11,94±0,4	12,98±0,3	12,51±0,2
3	Волокна семян подорожника	1,24±0,1	1,89±0,09	1,97±0,1	2,10±0,1	1,98±0,1	2,21±0,1
4	Волокно кокоса	6,11±0,09	6,51±0,2	7,25±0,1	8,35±0,2	9,95±0,2	10,05±0,5
5	Волокна корневища имбиря	4,02±0,1	7,24±0,5	7,98±0,3	8,1±0,7	7,8±0,2	7,5±0,3
6	Волокна плодов амлы (растворимые + нерастворимые)	16,59±0,2	16,14±0,7	16,84±0,3	15,16±0,4	17,12±0,6	16,98±0,6
7	Растворимое волокно амлы	19,96±0,3	24,75±0,5	24,13±0,6	23,42±0,7	22,76±0,8	23,17±0,5
8	Нерастворимое волокно амлы	6,98±0,1	6,74±0,1	6,92±0,2	6,95±0,2	7,18±0,1	7,60±0,1
9	Волокно оболочек семян подорожника	0,62±0,01	1,11±0,09	1,28±0,04	1,42±0,1	1,51±0,1	1,62±0,1
10	Волокно семян клюквы	19,70±0,4	19,15±0,3	20,50±0,9	19,76±0,7	19,67±0,9	20,60±0,8
11	Фруктоолигосахарид (FOS)	1,48±0,1	6,29±0,1	8,96±0,1	9,63±0,2	10,47±0,2	12,52±0,4
12	Растворимый крахмал картофеля	7,60±0,2	21,43±0,2	21,03±0,5	25,05±0,7	27,11±0,7	34,20±0,3

Пример 3. Ферментативный гидролиз.

100 мг панкреатина из поджелудочной железы свиней 4× USP (фармакопея США) (Sigma-Aldrich Corporation St. Louis MO, США) растворяли в 100 мл фосфатного буфера (50 мМ; pH 7,0). Далее, растительные природные волокна (2 г) растворяли в указанном выше растворе панкреатина и инкубировали при 37°C при 100 об/мин в течение 180 мин. Образцы отбирали в 0, 30, 60, 90, 120 и 180 мин. FOS также брали в исследовании в качестве эталона для сравнения с растительными природными волокнами и крахмал также брали в качестве контроля. Увеличение содержания восстанавливающих углеводов измеряли с реагентом на основе динитросалицилата (Оку и др. 1984. Journal of Nutrition 114, 1574-1581). Эффект ферментативного гидролиза (0,1% панкреатин в 20 мМ ФСБ (фосфатно-солевой буферный раствор) pH 7,0; 37°C, 100 об/мин), оказываемый на растительные природные волокна, представлен в табл. 3. Общее содержание восстанавливающих сахаров определяли способом на основе динитросалициловой кислоты (DNSA).

Таблица 3

№	Растительные природные волокна	Общее содержание восстанавливающих сахаров, выраженное в процентах					
		0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	180 мин
1	Волокна семян пажитника	7,20±0,1	8,15±0,1	11,85±0,8	11,35±0,8	10,55±0,1	10,70±0,2
2	Волокна семян <i>Lycium barbarum</i>	11,86±0,2	18,11±0,8	17,85±0,2	17,75±0,4	17,53±0,8	18,21±0,4
3	Волокна семян льна	1,12±0,1	2,56±0,05	2,57±0,1	2,98±0,1	2,78±0,08	2,88±0,04
4	Волокно кокоса	8,85±0,2	11,65±0,2	14,25±0,5	13,60±0,2	10,90±0,4	11,05±0,08
5	Волокна корневища имбиря	4,14±0,09	6,94±0,2	7,12±0,3	7,31±0,4	6,81±0,1	6,82±0,09
6	Волокна плодов амлы (растворимые + нерастворимые)	16,05±0,6	16,94±0,2	16,48±0,2	15,96±0,2	17,40±0,5	16,53±0,7
7	Растворимые волокна амлы	20,10±0,7	22,18±0,8	20,51±0,4	20,90±0,8	23,72±0,8	23,07±0,5
8	Нерастворимые волокна амлы	7,12±0,1	7,58±0,3	7,94±0,6	8,19±0,1	8,38±0,01	8,45±0,1
9	Волокно оболочек семян подорожника	1,05±0,1	2,21±0,1	2,26±0,1	2,28±0,02	2,29±0,05	3,07±0,1
10	Волокно семян клюквы	19,74±0,9	21,99±0,8	24,33±0,3	23,95±0,4	23,58±0,4	23,85±0,7
11	Фруктоолигосахарид (FOS)	1,10±0,01	3,37±0,09	3,12±0,09	3,01±0,1	3,43±0,09	3,34±0,08
12	Растворимый крахмал картофеля	7,45±0,05	52,56±0,9	54,06±1,1	52,29±1,2	52,10±1,5	54,52±1,1

Пример 4. Стимулирующая рост активность природных растительных волокон в отношении *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

Единичную выделенную колонию *Bacillus coagulans* MTCC 5856 инокулировали в бульон MRS (pH 7,0±0,2; HiMedia, Мумбаи, Индия) и инкубировали при 37°C при 120 об/мин в течение ночи. Получали растительные природные волокна отдельно (0,5, 1,0, 2,0 мас./об.%) и в средах MRS (не содержащих декстрозу) (0,5, 1,0, 2,0 мас./об.%). Бульон MRS и MRS (не содержащий декстрозу) также получали отдельно. Аналогичным образом, фруктоолигосахарид (FOS) также брали в исследовании в качестве контрольного эталона для сравнения с растительными природными волокнами. Итоговый pH всех сред доводили до 7,0. 5% выращенной за ночь культуры *Bacillus coagulans* MTCC 5856 инокулировали во все колбы и инкубировали при 37°C при 100 об/мин в течение 24 ч. Значения pH в 0 ч инкубации и после ферментации (24 ч) также записывали. Осуществляли последовательное разведение образцов в стерильном физиологическом растворе и подсчитывали количество жизнеспособных микроорганизмов при помощи посева на агаре с глюкозой и дрожжевым экстрактом (HiMedia, Мумбаи, Индия) в 0 ч и после ферментации (24 ч). Данные чашки инкубировали при 37°C в течение 48-72 ч. Каждый анализ проводили в трехкратной повторности в два разных приема. Средние значения количества жизнеспособных микроорганизмов выражены в log₁₀ КОЕ/мл (фиг. 1а-1в).

Пример 5. Ингибирование роста *E. coli*.

Эксперимент *in vitro* разрабатывали для оценки эффекта растительных природных волокон с пробиотическими бактериями *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в отношении ингибирования грамтрицательных патогенных бактерий *E. coli*. Кратко, 2,0 г растительных природных волокон добавляли к 100 мл деминерализованной воды. 0,5 г волокон оболочек семян подорожника и волокон семян льна добавляли к 100 мл деминерализованной воды в виду большой способности к гелеобразованию. pH доводили до 7,0±0,2 и автоклавировали при 121°C в течение 20 мин. После стерилизации в каждую колбу добавляли фермент Охугазе (Охугазе® для бульона, Охугазе, Inc, Мансфилд, штат Огайо, США), восстанавливающий кислород. *Bacillus coagulans* MTCC 5856 выращивали на агаре с глюкозой и дрожжевым экстрактом (HiMedia, Мумбаи, Индия) и *E. coli* ATCC 25922 выращивали на триптиказо-соевом агаре (HiMedia, Мумбаи, Индия). Использовали единичную выделенную колонию обеих культур и мутность бактериальной суспензии приводили к 0,5 в соответствие со стандартами мутности МакФарланда (соответствует 1,5×10⁸ колониеобразующим единицам (КОЕ)/мл). 1 мл *E. coli* ATCC 25922 добавляли в колбу, содержащую растительное природное волокно. Аналогично, в другой группе 1 мл *E. coli* ATCC 25922 и 1 мл *B. coagulans* MTCC 5856 добавляли в колбу, содержащую растительное природное волокно. Колбы инкубировали при 37°C при 100 об/мин в течение 24 ч. Осуществляли последовательное разведение образцов в стерильном физиологическом растворе и количество жизнеспособных *E. coli* ATCC 25922 подсчитывали при помощи посева на агар с эозином и метиленовым синим (Агар ЕМВ; HiMedia, Мумбаи, Индия) в 0 ч и после ферментации (24 ч). Чашки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Каждый анализ проводили в трехкратной повторности в два разных приема. Средние значения количества жизнеспособных микроорганизмов выражены в log₁₀ КОЕ/мл (фиг. 3).

Пример 6. Образование SCFA *Bacillus coagulans* MTCC 5856 с использованием растительных при-

родных волокон.

Ферментацию *in vitro* с *Bacillus coagulans* MTCC 5856 проводили следующим способом, описанным в "Effect of human faecal inoculum on *in vitro* fermentation variables" (McBurney M.I. и Thompson L.U., 1987, Brit J Nutr 58: 233-243), с некоторыми модификациями. Кратко, 2,0 г глюкозы или растительных природных волокон добавляли к 100 мл деминерализованной воды. 0,5 г волокна оболочек семян подорожника и волокон семян льна добавляли к 100 мл деминерализованной воды ввиду большой способности к гелеобразованию. pH доводили до $7,0 \pm 0,2$ и автоклавировали при 121°C в течение 20 мин. После стерилизации фермент Охугазе (Охугазе® для бульона, Охугазе, Inc, Мансфилд, штат Огайо, США), восстанавливающий кислород, добавляли в каждую колбу для создания анаэробных условий. 5% выросшей за ночь культуры *Bacillus coagulans* MTCC 5856 инокулировали во все колбы и инкубировали при 37°C при легком встряхивании при об/мин в течение 24 ч. Бутыли плотно закрывали и обеспечивали герметичность с помощью парафильма для поддержания анаэробных условий, создаваемых добавлением фермента. Значения pH в 0 ч инкубации и после ферментации (24 ч) также записывали. К каждому образцу добавляли 1 мл сульфата меди (10 г/л) для ингибирования дальнейшего роста микроорганизмов (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури, США). Анализ короткоцепочечных жирных кислот в образцах указанной выше ферментации проводили, принимая следующие параметры.

Реагенты.

1. Диэтиловый эфир (чистый для анализа).
2. H_2SO_4 .
3. Вода, очищенная при помощи обратного осмоса.
4. Хлорид натрия (чистый для анализа).

Условия хроматографирования.

Печь.

Скорость	Температура	Время удержания
Начальная	80°C	1,00 минута
$8^\circ\text{C}/\text{минута}$	200°C	2,00 минуты

1. Температура после разделения 220°C .
2. Время перерыва перед следующим анализом 5,0 мин.
3. Время разделения 18,00 мин.

На входе в колонку.

Вводимый объем	1 мкл
Температура	250°C
Режим	С разделением
Отношение деления потока	10:1

Колонка.

1. DB-FFAP (полиэтиленгликоль, модифицированный терефталевой кислотой).
2. Размеры: 30,00 м × 250,00 мм × 0,25 мкм.
3. Газ носитель: азот.
4. Поток: 1,0 мл/мин.

Детектор.

1. Тип	ПИД (Пламенно-ионизационный детектор)
2. Температура	350°C
3. Поток водорода	30,0 мл/мин
4. Поток воздуха	300,0 мл/мин
5. Поток газа-носителя	5,0 мл/мин

Приготовление стандартных растворов.

Навеску 100,0 мг каждого стандарта жирной кислоты (уксусная кислота, пропионовая кислота и масляная кислота) точно отбирали в мерную колбу, объемом 100 мл, и растворяли в 50,0 мл воды и объем доводили до метки водой и хорошо перемешивали (стоковый раствор). Далее, 10,0 мл стокового раствора разбавляли водой до 100,0 мл и хорошо перемешивали с получением стандартного раствора. 5 мл стандартного раствора подвергали экстракции, как описано ниже в данном документе.

1. Берут 5 мл стандартного раствора/образца.
2. К стандартному раствору добавляют 5 мл воды при перемешивании на вортексе в течение 0,5 мин.
3. Доводят pH до 1-1,5 3 M H_2SO_4 при перемешивании на вортексе в течение 0,5 мин.
4. Выдерживают диэтиловый эфир при -20°C вплоть до 1 ч перед добавлением к образцу/рабочему образцу.
5. Добавляют 10 мл диэтилового эфира при перемешивании на вортексе в течение 1 мин.

6. Добавляют 4 г хлорида натрия при перемешивании на вортексе в течение 1 мин.
7. Центрифугируют для разделения водного слоя и слоя диэтилового эфира.
8. Переносят 1,0 мл слоя диэтилового эфира в виалу для ГХ (газовой хроматографии) и вводят в хроматограф.

Способ.

1 мкл каждого экстрагированного стандартного раствора вводили в хроматограф в трехкратной повторности и записывали отклики основных пиков, обусловленных уксусной кислотой, пропионовой кислотой и масляной кислотой. Относительное стандартное отклонение в процентах для площади пиков, обусловленных уксусной кислотой, пропионовой кислотой и масляной кислотой, в трех введениях не должно быть более 2,0%. В хроматограф вводили 1,0 мкл каждого раствора экстрагированного образца. Содержание уксусной, пропионовой кислоты и масляной кислоты рассчитывали следующим образом.

$$\text{Содержание отдельно взятой кислоты в млн}^{-1} = \frac{\text{Площадь образца} \times \text{Конц. Станд (млн}^{-1})}{\text{Площадь стандарта}}$$

Результаты хроматографического анализа представлены на фиг. 4 и 5.

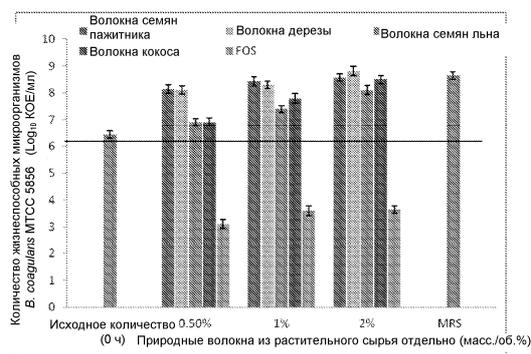
Несмотря на то что изобретение описано со ссылкой на предпочтительное воплощение, специалистам в данной области техники следует четко понимать, что изобретение им не ограничивается. Напротив, объем изобретения следует интерпретировать только вместе с прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

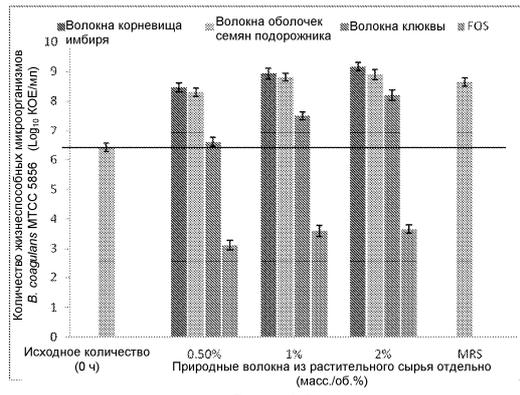
1. Способ увеличения количества жизнеспособных колоний *Bacillus coagulans* MTCC 5856, согласно которому культивируют *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lucium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).

2. Способ ингибирования патогенных грамотрицательных бактерий *E. coli*, согласно которому указанные бактерии приводят в контакт с *Bacillus coagulans* MTCC 5856 и сокультивируют в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lucium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).

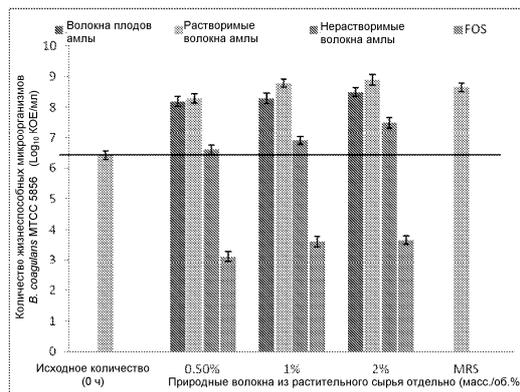
3. Способ получения короткоцепочечных жирных кислот, согласно которому культивируют *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в присутствии природных растительных волокон, выбранных из волокон семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), волокон семян *Lucium barbarum*, волокон семян *Linum usitatissimum* (лен), волокон эндосперма *Cocos nucifera* (кокос), волокон корневища *Zingiber officinale* (имбирь), волокон плодов *Emblica officinalis* (амла), волокон оболочек семян *Plantago ovata* (подорожник) и волокон семян *Vaccinium oxycoccos* (клюква).



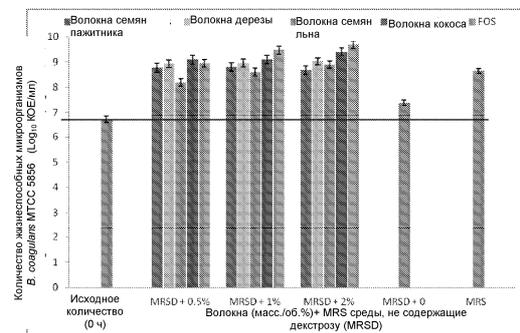
Фиг. 1а



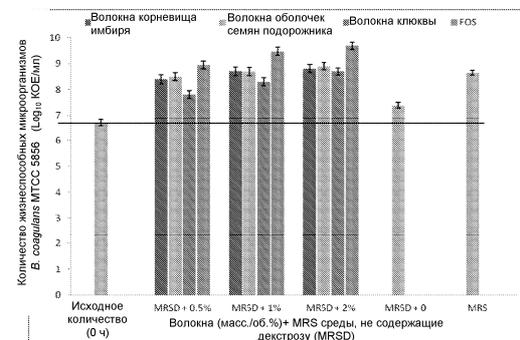
Фиг. 1б



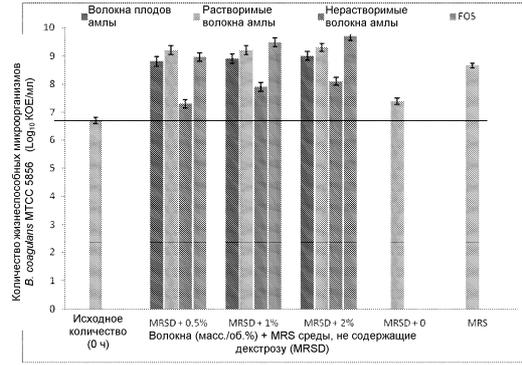
Фиг. 1в



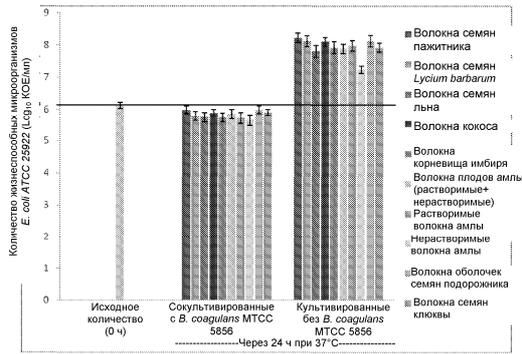
Фиг. 2а



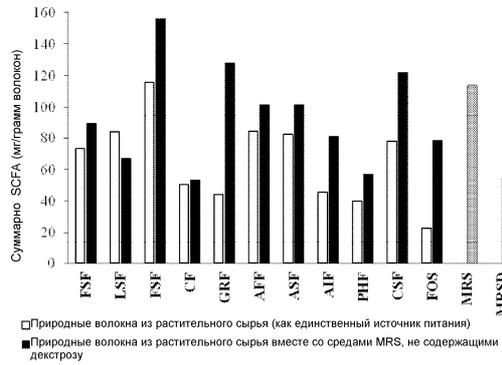
Фиг. 2б



Фиг. 2в



Фиг. 3



Фиг. 4

