

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034962**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.13

(51) Int. Cl. *C12N 1/00* (2006.01)

(21) Номер заявки
201591463

(22) Дата подачи заявки
2014.02.06

(54) **ВЫСУШЕННЫЕ СМЕСИ СО СПОСОБСТВУЮЩИМИ ПРОРАСТАНИЮ СПОР
СОЕДИНЕНИЯМИ**

(31) 61/849,973; 14/174,099

(56) WO-A1-199905310
WO-A1-199525163
US-A1-20030124104

(32) 2013.02.06; 2014.02.06

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/US2014/015076

(87) WO 2014/124120 2014.08.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНВИРА ЭЛАЙСИ, ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
**Хэшмэн Томми Юджин, Мэтени
Майкл (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев
В.Н., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю.,
Клюкин В.А., Строкова О.В., Захарова
Н.С., Христофоров А.А. (RU)**

(57) В соответствии с одним аспектом изобретение относится к высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, а также к способам получения такой однородной смеси. В соответствии с другим аспектом изобретение относится к содержащей такую однородную смесь композиции. Изобретение также относится к способам повышения прорастания, роста, метаболизма и/или ферментативной активности у бактериальной споры, предусматривающим получение однородной смеси из бактериальной споры и способствующего прорастанию соединения.

B1

034962

034962

B1

Ссылка на родственные заявки

В соответствии с настоящей заявкой испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 61/849973, поданной 6 февраля 2013 г., которая, таким образом, включена с помощью ссылки во всей ее полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, а также к способам получения такой смеси. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к содержащей такую смесь композиции. Настоящее изобретение также в целом относится к способам повышения прорастания, роста, метаболизма и/или ферментативной активности у бактериальных спор, предусматривающим получение высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение.

Предшествующий уровень техники изобретения

В последние годы стало широко распространенным применение спорообразующих бактерий, в том числе некоторых штаммов *Bacillus*, в качестве пробиотиков как для людей, так и для животных. Как указано в работе Кнар et al. (WO 2010/070005), такие виды как *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* применяются в качестве пищевых добавок в корм для животных для стимуляции роста в результате улучшения переваривания пищи и повышения доступности питательных веществ из корма для животных. *Bacillus coagulans* является активным ингредиентом в коммерческих пробиотических продуктах для потребления человеком, содействующим облегчению усвоения белков, лактозы и фруктозы.

Как указано у Maathuis et al. (2010, *Beneficial Microbes*, 1(1): 31-36), для функционирования в качестве пробиотиков такие бактерии должны присутствовать в тонком кишечнике в своей проросшей или вегетативной форме. Несмотря на то что такие микроорганизмы в своей споровой форме устойчивы как к действию кислоты желудка, так и к действию солей желчных кислот, они восприимчивы к таким средам в своих вегетативных состояниях. Таким образом, при использовании в их вегетативном состоянии штаммы *Bacillus* должны содержаться в фармацевтически приемлемом, устойчивом к действию кислоты или "кишечнорастворимом" носителе; смотри абзац 7 в работе Farmer (заявка на выдачу патента США 2003/0124104).

К сожалению, затруднительно получить такой состав с видами *Bacillus* в их вегетативной форме, чтобы они обладали приемлемым сроком годности. Как отмечено в литературе по продукту GanedenBC, традиционные растительные пробиотики не переносят сильное нагревание и давление в процессе производства, быстро погибают при хранении и чувствительны к действию кислот желудка и ферментов желчи в кишечнике. Напротив, составы с такими видами в их споровой форме намного лучше подходят для коммерческого и практического применения. Так, как отмечено у Cartman et al. (2008, *Applied and Environmental Microbiology*, Aug., p. 5254-5258), "[б]актериальные споры особенно хорошо подходят для применения в качестве продуктов на основе живых микроорганизмов, поскольку они являются спящими с точки зрения метаболизма и весьма стойкими к стрессу, оказываемому факторами окружающей среды. Такие присущие свойства являются весьма желательными с коммерческой точки зрения и означают, что продукты на основе спор характеризуются длительным сроком годности и сохраняют свою жизнеспособность в ходе распространения и хранения".

В литературе сообщалось о применении некоторых соединений, особенно некоторых L-аминокислот, для стимуляции прорастания спор *Bacillus*. Так, например, у Foerster et al. (1966, *Journal of Bacteriology* 91(3): 1168-1177) раскрыто, что добавление L-аланина в суспензии спор в водных растворах будет вызывать прорастание ряда видов *Bacillus*. Кроме того, Maathuis et al., ссылка на которых дана выше, предполагают, что можно запустить прорастание спор *Bacillus coagulans* в GanedenBC в начальном отделе тонкого кишечника в результате их поглощения вместе с пищей, содержащей L-аланин, или в результате включения L-аланина с такими спорами в порошок состав. Тем не менее, предлагаемые Maathuis подходы представляют собой несколько приведенных далее основных направлений по разработке эффективной с точки зрения пробиотических свойств бактериальной культуры.

1) Несмотря на то что споры *Bacillus coagulans*, используемые в GanedenBC, сами по себе по большей части устойчивы к низкому pH желудка, воздействие таких кислот может привести к запаздыванию в прорастании при входе таких спор в более нейтральный pH. Например, Blocher et al. (1985, *Applied and Environmental Microbiology* 50(2): 274-279) продемонстрировали, что у спор *B. cereus* подавлялось прорастание при pH 4,5 даже в присутствии способствующих прорастанию соединений L-аланина или L-цистеина. Споры, последовательно подвергнутые воздействию буфера с pH 4,5 с последующим буфером с pH 7,0, были способны прорасти под воздействием таких L-аминокислот, но у них наблюдали задержку в переходе к прорастанию. Любое существенное запаздывание в прорастание является весьма нежелательным, принимая во внимание относительно короткий период времени, в течение которого споры могут присутствовать в отделах тонкого кишечника до момента выведения из организма. Так обстоит дело прежде всего с небольшими животными, такими как цыплята, у которых время прохождения корма составляет приблизительно 1,5 ч в возрасте 1 сутки, а в возрасте 7 суток время прохождения составляет менее 2 ч (см. В.С. Watson et al. (2006, *Poultry Science* 85: 493-497), и креветки, у которых время прохож-

дения составляет менее 90 мин (см. Beseres et al., 2005, Journal of Shellfish Research 24(1) 301-308). Таким образом, сохраняется потребность в ускорении и улучшении прорастания бактериальных спор в условиях воздействия низкого pH, например, таких, которые встречаются в желудке.

2) Пища с высоким содержанием L-аланина также может иметь высокое содержание D-аланина. Как отмечено у Atluri et al. (2006, Journal of Bacteriology 188(1): 28-36) и Blocher et al. (ссылка на которых дана выше), D-аланин является мощным ингибитором прорастания *Bacillus*. Кроме того, в тонком кишечнике могут присутствовать большие количества других ингибиторов прорастания (например, других D-аминокислот, неорганических и органических кислот, жирных кислот и солей желчных кислот), которые могут конкурировать с L-аланином при смешивании в порошковой форме со спорами *Bacillus*. Таким образом, существует потребность в разработке способа улучшения прорастания спор в присутствии ингибиторов прорастания, которые могут конкурировать со способствующими прорастанию соединениями.

Соответственно настоящее изобретение относится к составу с бактериальными спорами, который может обладать такими полезными свойствами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Неожиданно было выявлено, что прорастание, рост, метаболизм и ферментативная активность бактериальных спор повышаются посредством формирования однородной смеси из бактериальной споры и способствующего прорастанию соединения.

Неожиданно и то, что однородная смесь также повышает прорастание и рост бактериальных спор в присутствии ингибиторов прорастания.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, причем бактериальная споры и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей высушенную однородную смесь, которая содержит бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, причем бактериальная споры и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду.

В соответствии со следующим аспектом настоящее изобретение относится к способу получения высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, причем способ предусматривает:

а) получение раствора, содержащего бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение; и

б) высушивание раствора с получением высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение,

причем бактериальная споры и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу повышения прорастания, роста, метаболизма и/или ферментативной активности бактериальных спор, предусматривающему:

а) получение раствора, содержащего бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение; и

б) высушивание раствора с получением высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную споры и способствующее прорастанию соединение, причем бактериальная споры и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду бактериальных спор; и

с) воздействие на однородную смесь средой, благоприятствующей прорастанию бактериальных спор, причем прорастание, рост, метаболизм и/или ферментативная активность бактериальных спор в однородной смеси повышаются по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует способствующее прорастанию соединение.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Смеси по настоящему изобретению состоят из бактериальной споры и способствующего прорастанию соединения. Используемый вид бактерий может представлять собой любой из видов, который формирует споры, и, как правило, представляет собой вид, который проявляет необходимую пробиотическую активность у людей или животных. Однако также можно использовать виды бактерий, которые имеют другое промышленное назначение, включая виды, которые применяют в сельском хозяйстве, восстановлении окружающей среды, компостировании или производстве метана, материалах для чистки и тому подобных. Такие виды включают спорогенных представителей типа Firmicutes и спорогенных представителей типа Actinobacteria, которые перечислены в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition (2009), тем самым включенным с помощью ссылки в полном его объеме. Представители

типа Firmicutes включают аэробные спорогенные виды (обычно ранее определяемые как виды *Bacillus*) и анаэробные спорогенные виды (обычно ранее определяемые как виды Clostridiimi). Иллюстративные виды типа Firmicutes включают *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei* и *Pasteuria nishizawa*, а также генетически модифицированные варианты таких видов. Предпочтительные виды включают *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* и *C. butyricum*.

Представители типа Actinobacteria включают виды *Streptomyces*, а также генетически модифицированные варианты таких видов. Предпочтительные виды включают *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* и *Streptomyces aureofaciens*.

Способствующее прорастаню соединение может включать любое соединение, которое эффективно вызывает прорастаню конкретных видов спорогенных бактерий, с которыми оно смешано в однородную смесь, и которое поддается обработке процессами, пригодными для формирования такой однородной смеси, такими как распылительная сушка, сублимационная сушка, воздушная сушка или сушка в барабанной сушилке. Обычно такие способствующие прорастаню соединения представляют собой L-аминокислоты, в том числе L-аланин, L-валин, L-пролин, L-лейцин, L-цистеин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин, L-фенилаланин и их аналоги. Такие аналоги могут быть получены специалистом в настоящей области посредством выполнения замен на или в группах базовой химии. Таким образом, например, аналоги L-аланина включают L-Leu-L-Ala, L-Ala-L-Leu, L-Pro-L-Ala, L-Ala-L-Pro, a-L-Glu-L-Ala, L-Ala-L-Glu, L-His-L-Ala, L-Ala-L-His, L-Ala-L-Ala, Gly-L-Ala, L-Ala-Gly, дициклогексиламмониевую соль N42-метилсульфонилэтилоксикарбонил-L-аланина (N-MSOC-L-Ala), N-трет-бутоксикарбонил-L-аланин (N-tBOC-L-Ala), N-ацетил-L-аланин (N-Ac-L-Ala), N-2,4-динитрофенил-L-аланин (N-DNP-L-Ala), N-карбобензоксид-L-аланин (N-CBZ-L-Ala), циклогексиламмонийную соль 5-диметиламино-1-нафталинсульфонил-L-аланина (N-дансил-L-Ala), N-бензоил-L-аланин (N-Bz-L-Ala), гидрохлорид сложного метилового эфира L-аланина, гидрохлорид сложного этилового эфира L-аланина, гидрохлорид сложного трет-бутилового эфира L-аланина, гидрохлорид сложного бензилового эфира L-аланина, L-аланинамид, гидрохлорид L-аланин-р-нитроанилида и L-аланинол. В соответствии с одним вариантом осуществления способствующее прорастаню соединение представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L-аланина, L-валина, L-пролина, L-лейцина, L-цистеина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина и L-фенилаланина. Предпочтительно такое способствующее прорастаню соединение представляет собой L-аланин.

Такие аминокислоты могут быть использованы в виде отдельных соединений или в форме полипептидов. В соответствии с одним вариантом осуществления полипептиды представляют собой белковые гидролизаты, например гидролизат казеина. Пригодные полипептиды обычно будут содержать по меньшей мере пятьдесят процентов аминокислот, которые будут функционировать как способствующие прорастаню вещества, таких как L-аланин, L-валин, L-пролин, L-лейцин, L-цистеин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин и L-фенилаланин, причем такие проценты взяты от числа аминокислот в полипептиде.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способствующее прорастаню соединение выбрано из группы, состоящей из L-аминокислот, белков, сахаров и солей. Особенно предпочтительные комбинации бактериальная спора/способствующее прорастаню включают L-аланин + *Bacillus subtilis*, L-аланин + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + *Bacillus pumilus*, L-аланин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + *Bacillus coagulans*, L-аланин + *Bacillus cereus*, L-аланин + *Bacillus clausii*, L-аланин + *Clostridium butyricum*, L-валин + *Bacillus subtilis*, L-валин + *Bacillus licheniformis*, L-валин + *Bacillus pumilus*, L-валин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-валин + *Bacillus coagulans*, L-валин + *Bacillus cereus*, L-валин + *Bacillus clausii*, L-валин + *Clostridium butyricum*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus subtilis*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus cereus*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus clausii*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus subtilis*, L-

аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus cereus*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Bacillus clausii*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+ионы калия (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-аланин + инозин + *Bacillus subtilis*, L-аланин + инозин + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + инозин + *Bacillus pumilus*, L-аланин + инозин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + инозин + *Bacillus coagulans*, L-аланин + инозин + *Bacillus cereus*, L-аланин + инозин + *Bacillus clausii*, L-аланин + инозин + *Clostridium butyricum*, L-пролин + глюкоза + *Bacillus megaterium*, L-пролин + *Bacillus megaterium* и L-лактат + *Clostridium butyricum*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предпочтительные смеси по настоящему изобретению включают смеси, в которых спора выбрана из группы, состоящей из *B. subtilis*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *B. pumilus*; а способствующее прорастанию соединение выбрано из группы, состоящей из L-аланина, L-валина и L-аспарагина.

Способствующее прорастанию соединение присутствует в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать прорастание используемой бактериальной споры. Несмотря на то, что это можно легко определить для любой конкретной смеси бактериальная спора/способствующее прорастанию соединение при помощи стандартного эксперимента, с такими способствующими прорастанию соединениями перед высушиванием обычно составляют смесь с концентрациями, составляющими от 0,0001 до 170 мг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления со способствующими прорастанию соединениями перед высушиванием составляют смесь с концентрациями, составляющими от 0,0003 до 170 мг/мл, от 0,0003 до 30 мг/мл, от 0,001 до 100 мг/мл или от 0,001 до 10 мг/мл. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления со способствующим прорастанию соединением перед высушиванием составляют смесь с концентрациями, составляющими от 0,001 до 1 мг/мл.

Используемый в настоящем документе термин "однородная смесь" относится к смеси, в которой споры и способствующие прорастанию соединения сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду.

Такую однородную смесь можно получить с использованием таких способов, как распылительная сушка, сублимационная сушка, воздушная сушка или сушка в барабанной сушилке. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления однородную смесь получают посредством распылительной сушки или сублимационной сушки. При формировании таких однородных смесей важно, чтобы споры и способствующее прорастанию соединение не перемешивали друг с другом при условиях, которые могли бы обеспечить возможность того, чтобы способствующее прорастание соединение вызвало прорастание споры, так как это может вызвать преждевременное прорастание с негативными последствиями для срока хранения смеси. Этого можно избежать путем использования отдельных потоков в распылительной сушилке либо посредством применения двух форсунок, либо одной форсунки, которая позволяет одновременное распыление двух отдельных потоков; или при помощи сублимационной сушки при условиях (например, температур), которые не способствуют прорастанию. Преждевременного прорастания также можно избежать посредством внесения споровой массы в раствор, содержащий способствующее прорастанию соединение, непосредственно перед высушиванием.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способствующее прорастанию соединение в однородной смеси адсорбируется на бактериальной споре или абсорбируется бактериальной спорой. В соответствии со следующим вариантом осуществления бактериальная спора и способствующее прорастанию соединение тонкодиспергированы по всей однородной смеси. В соответствии с еще одним следующим вариантом осуществления бактериальная спора и способствующее прорастанию соединение микроскопически диспергированы по всей однородной смеси так, чтобы отдельные частицы, состоящие фактически из бактериальных спор, и отдельные частицы, состоящие фактически из способствующих прорастанию соединений, не были видны невооруженным глазом.

В соответствии с одним вариантом осуществления однородную смесь получают путем объединения бактериальной споры и способствующего прорастанию соединения в растворе перед высушиванием. Предпочтительно бактериальная спора и способствующее прорастанию соединение объединяют в растворе непосредственно перед высушиванием.

Не желая придерживаться какой-либо теории, полагают, что в результате формирования однородной смеси происходит размещение способствующего прорастанию соединения в непосредственной близости к споре, при этом оно может более предпочтительно связываться с инициаторными участками прорастания у споры при попадании смеси в подходящую для прорастания среду. Такая непосредственная близость позволяет способствующему прорастанию соединению оттеснять на второй план соединения, препятствующие прорастанию (такие как D-аминокислоты), которые могут присутствовать, в результате чего будет прорасти больший процент спор. В связи с логарифмическим ростом бактерий при их вхождении в стадию вегетативного развития, такой повышенный процент может быстро привести к кратному логарифмическому росту при формировании культуры.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим однородную смесь, содер-

жащую (а) бактериальную спору и (b) способствующее прорастанию соединение, причем спора и способствующее прорастанию соединение сохраняются в неактивной форме так, чтобы способствующее прорастанию соединение не индуцировало прорастание споры до тех пор, пока такая композиция не будет подвергнута действию активирующей среды.

Используемый в настоящем документе термин "активирующая среда" относится к среде, которая позволяет способствующему прорастанию соединению и споре взаимодействовать так, чтобы спора индуцировалась к вхождению в вегетативное состояние. Такая активирующая среда может включать сочетание факторов, таких как температура, влажность, рН или содержание соли.

Формирование однородной смеси из способствующего прорастанию соединения и бактериальной споры может усилить полезность бактериальной споры посредством увеличения одной или нескольких представляющих интерес характеристик бактериальной споры, включая без ограничения прорастание, рост, метаболизм, ферментативную активность и устойчивость к стрессам окружающей среды, таким как низкий рН, высокая концентрация солей и воздействие токсичных металлов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однородная смесь повышает представляющую интерес характеристику по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500% по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует способствующее прорастанию соединение.

Для того чтобы дополнительно усилить прорастание предпочтительно, чтобы перед формированием однородной смеси спора была подвергнута шоку. Споры можно подвергнуть шоку рядом стандартных способов, например, осмотическим шоком, тепловым шоком, воздействием резкого изменения давления, недостатком питательных веществ и/или воздействием некоторыми кислотами. Тепловой шок предусматривает нагревание споры в течение достаточного периода времени при температуре, достаточной для индукции выработки белков теплового шока. Atluri et al., ссылка на который приведена выше, описывает один такой способ обработки для индукции теплового шока у *Bacillus subtilis*.

Композиции по настоящему изобретению содержат однородную смесь, содержащую бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение. Такие композиции могут дополнительно содержать дополнительные компоненты, в том числе сопутствующие способствующие прорастанию вещества, питательные вещества и вспомогательные для формирования составов средства (например, поверхностно-активные вещества и/или энтеросолюбильные покрытия), в зависимости от их предполагаемого применения.

Сопутствующие способствующие прорастанию вещества, которые можно использовать, включают пуриновые нуклеозиды, такие как инозин или аденозин, соли, сахара (такие как глюкоза и фруктоза) и тому подобные, при этом все они хорошо известны специалистам в настоящей области.

Также можно включить питательные вещества, в том числе декстрозу, виды крахмала и питательные микроэлементы, которые будут способствовать размножению таких бактериальных колоний после прорастания спор.

Если композиция предназначена для применения в качестве пробиотика, то предпочтительно задействуют применение энтеросолюбильного покрытия для того, чтобы избежать задержки в прорастании споры, связанной с воздействием на споры сред с низким рН. Такое энтеросолюбильное покрытие предназначено для защиты от раствора в желудке и для растворения в нейтральной или щелочной жидкости кишечника. Такое покрытие может быть чувствительным к рН, например, не растворяющимся в кислотной среде, с которой оно сталкивается в желудке, но растворяющимся в нейтральной среде, с которой оно сталкивается в тонком кишечнике. Альтернативно, энтеросолюбильное покрытие может растворяться при специфическом метаболическом событии, таком как встреча с пищеварительным ферментом, который встречается в тонком кишечнике. Например, покрытие расщепляется ферментом поджелудочной железы, таким как трипсин, химотрипсин или липаза поджелудочной железы. Расщепление или растворение покрытия позволяет споре *Bacillus*/способствующему прорастанию соединению попасть в благоприятную среду прорастания спор.

Материалы энтеросолюбильного покрытия, которые можно использовать, широко известны в настоящей области и включают альгинаты, оксиянтарная кислота-пропан-1,2-диол; производные целлюлозы, например, ацетатфталат целлюлозы или гидроксипропилметилцеллюлоза фталат (HPMCP); ацетатфталат целлюлозы, поливинилацетат фталат, гидроксипропилметилцеллюлозы фталат и анионные полимеры метакриловой кислоты и метилметакрилата; и водную эмульсию этилакрилатного сополимера метакрилатной кислоты или ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMAS).

При использовании в сельском хозяйстве или при промышленных применениях такие композиции могут дополнительно содержать стандартные вспомогательные для формирования составов средства, такие как поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, другие активные ингредиенты и т.д., при условии, что такие другие компоненты не препятствуют прорастанию или не оказывают неблагоприятного воздействия на жизнеспособность проросших спор. Например, известно, что фенольные соединения, которые в ином случае не являются особо спороцидными, ингибируют прорастание при концентрациях до 0,2% (фенол), 0,08% (крезол) и 0,02% (хлоркрезол) (вес./об.). Также из уровня техники хорошо известны другие соединения, которые могут ингибировать прорастание; см., например, A.D. Russell, Bacterial

Spores and Chemical Sporicidal Agents, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 1990, p. 99-119.

Настоящее изобретение также относится к способу получения высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение, причем способ предусматривает:

а) получение раствора, содержащего бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение; и

б) высушивание раствора с получением высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение, причем бактериальная спора и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в благоприятствующую прорастанию среду.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления высушивание согласно вышеуказанному способу представляет собой распылительную сушку, сублимационную сушку, воздушную сушку или сушку в барабанной сушилке. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления спору согласно описанному выше способу выбирают из группы, состоящей из *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinoliticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* и *Streptomyces* spp.

В соответствии со следующим предпочтительным вариантом осуществления спору согласно описанному выше способу выбирают из группы, состоящей из *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *B. pumilus*; а способствующее прорастанию соединение выбирают из группы, состоящей из L-аланина, L-валина и L-аспарагина.

Со способствующим прорастанию соединением согласно вышеупомянутому способу перед высушиванием можно составить смесь с концентрациями от 0,0001 до 170 мг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вышеупомянутого способа со способствующими прорастанию соединениями перед высушиванием составляют смесь с концентрациями от 0,0003 до 170 мг/мл, от 0,0003 до 30 мг/мл, от 0,001 до 100 мг/мл или от 0,001 до 10 мг/мл. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа со способствующим прорастанию соединением перед высушиванием составляют смесь с концентрациями, составляющими от 0,001 до 1 мг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способствующим прорастанию соединением в вышеупомянутом способе является полипептид. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа спора была подвергнута шоку.

Настоящее изобретение также относится к высушенной однородной смеси, получаемой посредством вышеупомянутых способов.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу повышения прорастания, роста, метаболизма и/или ферментативной активности бактериальных спор, предусматривающему:

а) получение раствора, содержащего бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение; и

б) высушивание раствора с получением высушенной однородной смеси, содержащей бактериальную спору и способствующее прорастанию соединение, причем бактериальная спора и способствующее прорастанию соединение сохраняются в непосредственной близости друг от друга до тех пор, пока они не попадут в среду, благоприятствующую прорастанию бактериальных спор; и

в) воздействие на однородную смесь средой, благоприятствующей прорастанию бактериальных спор, причем прорастание, рост, метаболизм и/или ферментативная активность бактериальных спор в однородной смеси повышаются по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует способствующее прорастанию соединение.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вышеупомянутого способа однородная смесь повышает представляющую интерес характеристику по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500% по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует способствующее прорастанию соединение.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа процент прорастания, роста, метаболизма и/или ферментативной активности бактериальных спор в однородной смеси повышается по меньшей мере на 10% по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует способствующее прорастанию соединение. В соответствии со следующим предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа высушивание представляет собой распылительную сушку, сублимационную сушку, воздушную сушку или сушку в барабанной сушилке.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления споры в описанном выше способе выбирают из группы, состоящей из *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidarius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* и *Streptomyces* spp. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления споры выбирают из группы, состоящей из *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *B. pumilus*; а способствующее прорастанию соединение выбирают из группы, состоящей из L-аланина, L-валина и L-аспарагина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вышеупомянутого способа способствующее прорастанию соединение представляет собой полипептид. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления со способствующим прорастанию соединением согласно вышеупомянутому способу перед высушиванием составляют смесь с концентрациями от 0,0001 до 170 мг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вышеупомянутого способа со способствующими прорастанию соединениями перед высушиванием составляют смесь с концентрациями от 0,0003 до 170 мг/мл, от 0,0003 до 30 мг/мл, от 0,001 до 100 мг/мл или от 0,001 до 10 мг/мл. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа со способствующим прорастанию соединением перед высушиванием составляют смесь с концентрациями, составляющими от 0,001 до 1 мг/мл. В соответствии со следующим предпочтительным вариантом осуществления вышеупомянутого способа спора была подвергнута шоку.

Примеры

Последующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, но совершенно не предназначены каким бы то ни было образом ограничивать настоящее изобретение.

В приведенных далее примерах термины "GOSD" и "GO+" относятся к композициям, в которых оптимизатор прорастания (L-аланин, если не указано иное) был высушен распылением с конкретным указанным видом *Bacillus*. Споры вида *Bacillus* были высушены распылением, при этом L-аланин был внесен в споровую массу непосредственно перед сушкой распылением в виде раствора, содержавшего 0,044 г аланина на 1 мл дистиллированной воды.

Термин "GO-" относится к композициям, в которых вид *Bacillus* был аналогично высушен распылением в отсутствие способствующего прорастанию соединения.

Кроме того, в приведенных далее примерах, если не указано иное, для определения прорастания спор использовали нижеописанный способ. При переносе спор в питательные растворы и начале их прорастания они высвобождают дипиколиновую кислоту и ионы, что приводит к потемнению. Данный показатель прорастания приводит к понижению оптической экстинкции видимого света суспензией спор. Таким образом, скорость прорастания определяют путем подсчета доли спор темной/светлой фазы и отслеживания понижения оптической плотности при 600 нм (O.D.600) в суспензии прорастающих спор в спектрофотометре УФ-видимой части спектра. Затем ее преобразовывали в процент прорастания.

Пример 1. Повышенное прорастание ENV 923 *B. subtilis* в однородной смеси с L-аланином.

Для того чтобы сравнить скорость прорастания спор однородных смесей по настоящему изобретению со скоростью прорастания спор, традиционно смешиваемых с вызывающим прорастание веществом, проводили описанные далее обработки.

А. Получение однородной смеси.

Споры вида ENV 923 *B. subtilis* сушили распылением, при этом L-аланин вносили в споровую массу непосредственно перед сушкой распылением в виде раствора, содержавшего 0,044 г аланина на 1 мл дистиллированной воды. Полученную однородную смесь проращивали посредством последующего внесения в раствор, состоявший из 0,01 М фосфатного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7, и калибровали до начальной O.D.600, составлявшей 0,6.

В. Традиционное смешивание спор с вызывающим прорастание веществом.

Споры ENV 923 *B. subtilis* сушили распылением и впоследствии вносили в раствор, состоявший из 0,01 М фосфатного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7. Споры добавляли в буферный раствор для калибровки до начальной O.D.600, составлявшей 0,6. Аланин добавляли к раствору в концентрации 0,0001 г аланина на 1 мл раствора.

С. Прорастание спор самих по себе.

Споры ENV 923 *B. subtilis* сушили распылением и впоследствии вносили в раствор, состоявший из 0,01 М фосфатного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7, и калибровали до начальной O.D.600, составлявшей 0,6.

Проводили две повторности каждой такой обработки. В приведенной ниже таблице 1 показаны средние результаты таких обработок, оказывавших влияние на прорастание ENV 923 *B. subtilis*, которое измеряли по проценту падения оптической плотности. Падение оптической плотности указывало на про-

грессирование прорастания. Оптическую плотность (OD) измеряли при длине волны 600 нм с помощью спектрофотометра видимой части спектра Jenway, модели 6320D. Использованный L-аланин имел степень чистоты 99% и был получен от Alfa Aesar; Neysam, Ланкашир, Великобритания.

Таблица 1

Процент уменьшения от исходного уровня OD (600 нм) с течением времени

| Время замера (минуты) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
|-------------------------|----|------|-------|-------|-------|
| Однородная смесь | 0% | 2,7% | 17,7% | 34,3% | 41,2% |
| Традиционное смешивание | 0% | 0,5% | 18,8% | 31,9% | 33,7% |
| Споры сами по себе | 0% | 1,3% | 3,2% | 4,1% | 7,5% |

Из приведенных выше результатов видно, что споры в однородных смесях по настоящему изобретению прорастали быстрее, чем это делали споры, которые не были однородно смешаны с тем же вызывающим прорастание веществом. У споры, смешанной с вызывающим прорастание веществом, наблюдали намного лучшее прорастание, чем у спор самих по себе.

Пример 2. Повышенное прорастание штамма ENV923 *Bacillus subtilis*, обработанного посредством GOSD.

Споры *Bacillus subtilis* обрабатывали GOSD посредством сухой распылением спор в присутствии раствора L-аланина и определяли уровни прорастания по значениям оптической плотности (OD).

0,01 М буфер на основе фосфата калия, pH 7.

0,01 М буфер на основе фосфата калия готовили с применением 1 М раствора K_2HPO_4 (87,09 г, растворенные в 0,5 л дистиллированной воды) и 1 М раствора KH_2PO_4 (68,045 г, растворенные в 0,5 л дистиллированной воды). При объединении 61,5 мл 1 М K_2HPO_4 с 38,5 мл 1 М KH_2PO_4 и разведении до 1000 мл дистиллированной водой получали 0,1 М буфер на основе фосфата калия с pH 7,0. После разведения 0,1 М буфера на основе фосфата калия дистиллированной водой в соотношении 1:10 получали 0,01 М буфер на основе фосфата калия, pH 7,0. Буфер стерилизовали путем автоклавирования при 121°C в течение 60 мин.

Суспензии спор *Bacillus subtilis* готовили в концентрации $1,7 \times 10^8$ Кое/мл в 0,01 М буфере на основе фосфата калия, pH 7,0, инкубировали в предварительно нагретой до 37°C водяной бане и оценивали в отношении процента прорастания с интервалами в 5 мин на протяжении периода, составлявшего 45 мин.

Таблица 2

| % прорастания ENV923 <i>Bacillus subtilis</i> при 37°C с и без обработки посредством GOSD | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Минуты | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
| <i>B. subtilis</i> , GOSD | 0 | 13% | 45% | 63% | 64% | 75% | 76% | 80% | 81% | 83% |
| <i>B. subtilis</i> , контроль | 0 | 7% | 9% | 10% | 11% | 14% | 14% | 16% | 18% | 19% |

Вывод: обработка посредством GOSD значительно повышала процент прорастания и скорость прорастания спор *Bacillus subtilis*.

Пример 3. Повышенное прорастание штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанного посредством GOSD.

Споры *Bacillus licheniformis* обрабатывали GOSD посредством сухой распылением спор в присутствии 0,044 г L-аланина на 1 мл дистиллированной воды, как описано в примере 1. Уровни прорастания определяли по значениям оптической плотности (OD), как описано выше, с применением 0,01 М буфера на основе фосфата калия, pH 7,0, для препарата суспензии спор.

Суспензии спор *Bacillus licheniformis* готовили в концентрации $1,29 \times 10^8$ Кое/мл в 0,01 М буфере на основе фосфата калия, pH 7,0, инкубировали в предварительно нагретой до 37°C водяной бане и оценивали в отношении процента прорастания с интервалами в 5 мин на протяжении периода, составлявшего 45 мин.

Таблица 3

| % прорастания обработанных и необработанных суспензий спор <i>Bacillus licheniformis</i> | | | | | | | | | | |
|--|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Минуты | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
| <i>B. licheniformis</i> , контроль | 0 | 1% | 5% | 3% | 10% | 11% | 10% | 10% | 10% | 10% |
| <i>B. licheniformis</i> , GOSD | 0 | 4% | 5% | 39% | 60% | 81% | 85% | 88% | 91% | 91% |

Вывод: обработка посредством GOSD значительно повышала процент прорастания и скорость прорастания спор *Bacillus licheniformis*.

Пример 4. Повышенное прорастание при различных уровнях pH для штамма ENV923 *Bacillus subtilis*, обработанного посредством GOSD.

GO+ и GO- споры штамма ENV923 *Bacillus subtilis* готовили как описано выше и ресуспендировали в 0,01 М буфере на основе фосфата калия с различными уровнями pH. Измерения O.D.600 проводили, как описано выше.

0,01 М буферы на основе фосфата калия с рН 3,0-7,0.

0,01 М буфер на основе фосфата калия, рН 7,0, готовили, как описано в примере 1.

Для приготовления 0,01 М буферов на основе фосфата калия с диапазоном рН от 3,0 до 6,0 в качестве основного буфера использовали 0,1 М буфер на основе фосфата калия, рН 6,0, полученный в результате смешивания 13,2 мл 1 М раствора K_2HPO_4 и 86,8 мл 1 М раствора KH_2PO_4 (описанных в примере 1) и доведения до объема 1 л дистиллированной водой.

Для получения 0,01 М буферов на основе фосфата калия с рН 5,0-3,0 разводили 0,1 М буфер на основе фосфата калия, рН 6,0, дистиллированной водой, рН буферов понижали до рН 5,0, 4,0 и 3,0 с помощью 1 М H_2PO_4 и конечный объем доводили дистиллированной водой, придерживаясь соотношения 0,1 М буфера к дистиллированной воде 1:10.

Приготовленные буферы хранили при 4°C и перед каждым экспериментом рН буферов повторно корректировали с помощью 1 М NaOH или 1 М H_2PO_4 .

Таблица 4

Результаты прорастания с GOSD (GO+) и без GOSD (GO-) при различных уровнях рН, в таблице показан процент прорастания, измеренный с интервалами в 5 мин

| Минуты | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GO+, рН 7 | 0 | 8% | 48% | 69% | 80% | 84% | 88% | 90% | 91% | 92% |
| GO-, рН 7 | 0 | 3% | 3% | 8% | 10% | 11% | 13% | 14% | 16% | 16% |
| GO+, рН 6 | 0 | 4% | 40% | 58% | 69% | 75% | 77% | 78% | 81% | 82% |
| GO-, рН 6 | 0 | 1% | 4% | 5% | 9% | 8% | 11% | 13% | 12% | 12% |
| GO+, рН 5 | 0 | 7% | 24% | 34% | 39% | 41% | 43% | 45% | 46% | 46% |
| GO-, рН 5 | 0 | 4% | 4% | 5% | 5% | 6% | 6% | 7% | 7% | 7% |
| GO+, рН 4 | 0 | 5% | 23% | 28% | 30% | 31% | 33% | 32% | 33% | 34% |
| GO-, рН 4 | 0 | 3% | 4% | 5% | 4% | 4% | 5% | 3% | 4% | 4% |
| GO+, рН 3,5 | 0 | 5% | 11% | 16% | 18% | 18% | 18% | 18% | 20% | 20% |
| GO-, рН 3,5 | 0 | 2% | 1% | 1% | 1% | 1% | 1% | 2% | 0% | 1% |
| GO+, рН 3 | 0 | 11% | 16% | 19% | 19% | 22% | 21% | 22% | 21% | 22% |
| GO-, рН 3 | 0 | 4% | 4% | 4% | 5% | 2% | 3% | 4% | 2% | 4% |

Вывод: обработка посредством GOSD позволяла спорам *Bacillus subtilis* прорасти быстрее и преодолевать эффекты более низких уровней рН.

Пример 5. Повышенное прорастание штамма ENV923 *Bacillus subtilis*, обработанного посредством GOSD. Реакция прорастания спор в зависимости от различных уровней температуры. В таблице показан процент прорастания, измеренный с интервалами в 10 мин.

GOSD и контрольные споры штамма ENV 923 *Bacillus subtilis* готовили как описано выше. Прорастание спор тестировали путем измерений оптической плотности (OD), как описано выше. Для измерений O.D.600 готовили суспензии спор и охлаждали до 4°C в 0,01 М буфере на основе фосфата калия, рН 7,0 (фосфатный буфер, препарат с рН 7,0), с концентрацией $1,7 \times 10^8$ Кое/мл. Для каждой суспензии спор готовили 3 культуральные пробирки, заполненные до 3 мл объема. После помешивания и измерения начальной O.D.600 пробирки инкубировали в водяных банях, предварительно нагретых до 25, 30 и 37°C, в течение 120 мин. С интервалами в 10 мин содержимое пробирок помешивали и проводили измерение O.D.600.

Таблица 5

Процент прорастания *Bacillus subtilis* с GO- и GO+ при 37, 30 и 25°C

| Минуты | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GO+, 37°C | 0 | 36% | 58% | 63% | 68% | 70% | 70% | 71% | 70% | 70% | 70% | 70% | 70% |
| GO+, 30°C | 0 | 12% | 32% | 45% | 52% | 55% | 58% | 59% | 58% | 60% | 60% | 60% | 60% |
| GO+, 25°C | 0 | 1% | 9% | 16% | 23% | 28% | 32% | 33% | 35% | 37% | 36% | 35% | 35% |
| GO-, 37°C | 0 | 1% | 4% | 6% | 7% | 9% | 9% | 9% | 9% | 9% | 9% | 9% | 9% |
| GO-, 30°C | 0 | 0% | 2% | 3% | 4% | 6% | 6% | 7% | 7% | 8% | 9% | 8% | 7% |
| GO-, 25°C | 0 | 0% | 2% | 3% | 4% | 5% | 7% | 8% | 8% | 9% | 10% | 10% | 10% |

Вывод: обработка посредством GOSD (GO+) позволяла спорам *Bacillus subtilis* прорасти быстрее и преодолевать эффекты более низких температурных режимов.

Пример 6. Процент прорастания *Bacillus licheniformis* с и без GOSD в присутствии растворов с различной молярностью NaCl.

Среда.

Среда представляла собой разведенный триптический соевый бульон (mTSB) (BD, 211822). Среду готовили посредством суспендирования 50 мг порошка для приготовления триптического соевого бульона в 1 л воды с нагреванием и помешиванием до полного растворения. Затем ее разделяли на аликвоты в бутылки и автоклавировали в течение 30 мин при 121°C. Исходя из сообщаемого производителем содержания порошка, среда mTSB содержала на 1 л: панкреатический гидролизат казеина: 28,3 мг; папаиновый гидролизат соевой муки: 5,0 мг; декстроза: 4,2 мг; хлорид натрия: 8,3 мг; дикалия фосфат: 4,2 мг.

Перед нагреванием и автоклавированием среды для индукции осмотического стресса при необходимости добавляли хлорид натрия (Amresco X190) так, чтобы конечные концентрации составляли 0,5 или 1,5 М (29,22 и 87,66 г/л соответственно).

Суспензии спор.

Порошки спор штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанные или не обработанные посредством GOSD, суспендировали в стерильной воде с 0,1% Octosol SLS (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Долтон, Вирджиния) в стерильном сосуде смесителя. Споры суспендировали посредством перемешивания в течение 5-секундных интервалов на протяжении суммарно по меньшей мере 15 с или до тех пор, пока визуально споры не были полностью суспендированы. Это осуществляли так, чтобы конечная концентрация в сосуде смесителя составляла 1×10^{10} Кое/мл. Из этой суспензии спор 250 мкл переносили в пробирки, содержавшие 4,75 мл mTSB, с получением конечной концентрации, составлявшей 5×10^8 Кое/мл. Такие концентрации определяли посредством оптимизаций, которые осуществляли на каждой партии спор, до достижения начальной O.D.600, составлявшей приблизительно 0,6.

Анализ прорастания по OD.

Пробирки, содержавшие суспендированные споры, без задержки встряхивали на вортексе, измеряли при O.D.600 для нулевой точки времени и инкубировали в 37°C водяной бане. Через соответствующие временные интервалы регистрировали время, пробирки забирали, встряхивали на вортексе, измеряли при O.D.600 и возвращали в водяную баню. Процент повышения O.D.600 определяли путем вычитания измеренного значения из нулевой точки времени с делением на нулевую точку времени и умножением на 100%. Ранее было задокументировано, что полное прорастание соответствовало проценту понижения O.D.600, равному 60%. Таким образом, процент прорастания определяли путем умножения процента уменьшения O.D.600 на 1,67.

Таблица 6
% прорастания спор *Bacillus licheniformis* через 1 ч с GOSD (GO+) и без него (GO-) в присутствии 0, 0,5 молярного и 1,5 молярного растворов NaCl

| Время | GO+, 0 | GO-, 0 | GO+, | GO-, | GO+, | GO-, |
|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | М | М | 0,5 М | 0,5 М | 1,5 М | 1,5 М |
| 0:00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0:11 | 7% | 0% | 29% | 1% | 15% | 2% |
| 0:16 | 23% | 0% | 49% | 0% | 30% | 0% |
| 0:22 | 44% | 3% | 61% | 0% | 44% | 0% |
| 0:27 | 53% | 0% | 67% | 0% | 48% | 0% |
| 0:32 | 59% | 0% | 70% | 1% | 53% | 0% |
| 0:38 | 64% | 0% | 74% | 1% | 56% | 0% |
| 0:43 | 68% | 0% | 75% | 0% | 58% | 0% |
| 0:49 | 71% | 0% | 77% | 0% | 61% | 0% |
| 0:55 | 72% | 0% | 77% | 2% | 63% | 0% |
| 1:01 | 75% | 0% | 78% | 2% | 66% | 0% |

Вывод: обработка посредством GOSD позволяла спорам *Bacillus licheniformis* прорасти быстрее и преодолевать воздействия осмотического стресса различных уровней ионов алюминия.

Пример 7. Процент прорастания *Bacillus licheniformis* с и без GOSD в присутствии растворов с различным содержанием меди в частях на миллион.

Среда.

Среду mTSB готовили как описано выше, но дополняли NaCl до конечной концентрации, составлявшей 50 мМ, с получением осмотически сбалансированной среды. 1×10^5 ppm базовый раствор гексагидрата нитрата меди(II) (Alfa Aesar 12523) получали посредством суспендирования 2 г в 20 мл

воды и фильтрования через 0,22-мкм фильтр. Его добавляли к аликвотам mTSB до достижения конечных концентраций 0, 50, 100 и 200 ppm.

Суспензии спор.

Порошки спор штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанные или не обработанные посредством GOSD, суспендировали в стерильной воде с 0,1% Octosol SLS (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Долтон, Вирджиния) в стерильном сосуде смесителя. Споры суспендировали посредством перемешивания в течение 5-секундных интервалов на протяжении суммарно по меньшей мере 15 с или до тех пор, пока визуально споры не были полностью суспендированы. Это осуществляли так, чтобы конечная концентрация в сосуде смесителя составляла 2×10^9 Кое/мл. Из этой суспензии спор 250 мкл переносили в пробирки, содержавшие 4,75 мл mTSB, с получением конечной концентрации, составлявшей 1×10^8 Кое/мл. Такие концентрации определяли посредством оптимизаций, которые осуществляли на каждой партии спор, до достижения начальной O.D.600, составлявшей приблизительно 0,6.

Анализ прорастания по OD.

Осуществляли и рассчитывали, как указано в примере 6.

Таблица 7

Процент прорастания спор *Bacillus licheniformis* через 1 ч с GOSD (GO+) и без него (GO-) в присутствии 0, 50, 100 и 200 ppm растворов ионов меди

| Время | GO+, 0 | GO-, 0 | GO+, 50 | GO-, 50 | GO+, 100 | GO-, 100 | GO+, 200 | GO-, 200 |
|-------|--------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | ppm | ppm | ppm | ppm | ppm | ppm | ppm | ppm |
| 0:00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0:05 | 3,1% | 0,6% | 7,7% | 1,5% | 7,8% | 1,4% | 5,0% | 2,8% |
| 0:11 | 19,8% | 1,1% | 14,3% | 2,0% | 12,5% | 1,9% | 9,0% | 4,6% |
| 0:16 | 34,1% | 2,2% | 25,2% | 2,0% | 16,7% | 3,3% | 11,5% | 4,6% |
| 0:21 | 40,9% | 4,4% | 30,7% | 1,5% | 19,3% | 5,1% | 14,0% | 4,6% |
| 0:26 | 47,7% | 4,4% | 34,0% | 2,0% | 18,2% | 5,1% | 15,0% | 6,5% |
| 0:31 | 50,2% | 4,4% | 38,4% | 1,5% | 21,9% | 5,6% | 15,0% | 5,6% |
| 0:36 | 50,8% | 4,4% | 38,9% | 0,5% | 20,8% | 6,1% | 17,0% | 6,0% |
| 0:41 | 52,0% | 3,3% | 40,6% | 1,5% | 21,4% | 6,5% | 18,0% | 5,6% |
| 0:47 | 55,8% | 3,9% | 45,0% | 3,0% | 26,0% | 7,5% | 20,0% | 6,0% |
| 0:53 | 57,0% | 2,8% | 44,4% | 2,5% | 25,5% | 8,4% | 19,5% | 6,0% |
| 0:58 | 57,6% | 3,9% | 45,5% | 3,0% | 25,0% | 8,4% | 20,5% | 6,9% |
| 1:04 | 60,1% | 4,4% | 45,0% | 1,0% | 24,5% | 8,4% | 21,0% | 4,6% |

Вывод: обработка посредством GOSD позволяла спорам *Bacillus licheniformis* прорасти быстрее и преодолевать стрессовые воздействия различных уровней ионов меди.

Пример 8. Процент прорастания *Bacillus licheniformis* с и без GOSD в присутствии растворов с различным содержанием алюминия в частях на миллион.

Среда.

Среду mTSB готовили, как описано выше, но дополняли NaCl до конечной концентрации, составлявшей 50 mM, с получением осмотически сбалансированной среды. 1000 ppm базовый раствор Al^{3+} получали посредством суспендирования 0,62 г $Al_2(SO_4)_3 \cdot 14 H_2O$ (Alfa Aesar 12362) в 50 мл воды и фильтрования через 0,22-мкм фильтр. Его добавляли к аликвотам mTSB до достижения конечных концентраций 0, 0,25, 0,50 и 1,0 ppm. Затем pH среды снижали до pH 4,5 посредством добавления HCl для осуществления полного отделения иона Al^{3+} .

Суспензии спор.

Порошки спор штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанные или не обработанные посредством GOSD, суспендировали в стерильной воде с 0,1% Octosol SLS (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Долтон, Вирджиния) в стерильном сосуде смесителя. Споры суспендировали посредством перемешивания в течение 5-секундных интервалов на протяжении суммарно по меньшей мере 15 с или до тех пор, пока визуально споры не были полностью суспендированы. Это осуществляли так, чтобы конечная концентрация в сосуде смесителя составляла 1×10^{10} Кое/мл. Из этой суспензии спор 250 мкл переносили в пробирки, содержавшие 4,75 мл mTSB, с получением конечной концентрации, составлявшей 5×10^8 Кое/мл. Такие концентрации определяли посредством оптимизаций, которые осуществляли на каждой партии спор, до достижения начальной O.D.600, составлявшей приблизительно 0,6.

Анализ прорастания по OD.

Осуществляли и рассчитывали, как описано в примере 6.

Таблица 8

Процент прорастания спор *Bacillus licheniformis* через 1 ч с GOSD (GO+) и без него (GO-) в присутствии 0, 0,25, 0,50 и 1,0 ppm растворов ионов алюминия

| Время | GO+, | GO-, 0 | GO+, | GO-, 0,25 | GO+, | GO-, 0,50 | GO+, | GO-, 1,00 |
|-------|------|--------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | 0 | ppm | 0,25 ppm | ppm | 0,50 ppm | ppm | 1,00 ppm | ppm |
| 0:00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0:07 | 21% | 2% | 9% | 1% | 26% | 2% | 30% | 3% |
| 0:14 | 48% | 3% | 47% | 4% | 50% | 4% | 52% | 3% |
| 0:22 | 62% | 3% | 60% | 5% | 63% | 4% | 63% | 4% |
| 0:30 | 67% | 2% | 66% | 4% | 67% | 4% | 67% | 3% |
| 0:37 | 70% | 3% | 68% | 5% | 70% | 4% | 70% | 3% |
| 0:44 | 71% | 3% | 69% | 4% | 71% | 4% | 71% | 3% |
| 0:52 | 72% | 3% | 70% | 4% | 72% | 5% | 71% | 3% |
| 0:59 | 72% | 3% | 70% | 5% | 74% | 6% | 73% | 4% |
| 1:07 | 72% | 3% | 72% | 5% | 74% | 5% | 72% | 4% |

Вывод: обработка посредством GOSD позволяла спорам *Bacillus licheniformis* прорасти быстрее и преодолевать стрессовые воздействия различных уровней ионов алюминия.

Пример 9. Процент прорастания *Bacillus licheniformis* с и без GOSD в присутствии растворов с различной миллимолярностью солей желчных кислот.

Среда.

Среду mTSB готовили, как описано выше, но дополняли NaCl до конечной концентрации, составлявшей 50 мМ, с получением осмотически сбалансированной среды. 80 мМ базовый раствор солей желчной кислоты получали посредством суспендирования 2,5 г тауродезоксихолата натрия (Sigma T0875), 1,1 г глюкодезоксихолата натрия (Sigma G9910) и 0,346 г дезоксихолата натрия (Sigma D5670) в 100 мл воды и фильтрация через 0,22-мкм фильтр. Его добавляли к аликвотам mTSB до достижения конечных концентраций 0, 4, 6 и 8 мМ.

Суспензии спор.

Порошки спор штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанные или не обработанные посредством GOSD, суспендировали в стерильной воде с 0,1% Octosol SLS (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Долтон, Вирджиния) в стерильном сосуде смесителя. Споры суспендировали посредством перемешивания в течение 5-секундных интервалов на протяжении суммарно по меньшей мере 15 с или до тех пор, пока визуально споры не были полностью суспендированы. Это осуществляли так, чтобы конечная концентрация в сосуде смесителя составляла 1×10^{10} Кое/мл. Из этой суспензии спор 250 мкл переносили в пробирки, содержавшие 4,75 мл mTSB, с получением конечной концентрации, составлявшей 5×10^8 Кое/мл. Такие концентрации определяли посредством оптимизаций, которые осуществляли на каждой партии спор, до достижения начальной O.D.600, составлявшей приблизительно 0,6.

Анализ прорастания по OD.

Осуществляли и рассчитывали, как описано выше.

Таблица 9

Процент прорастания спор *Bacillus licheniformis* через 1 ч с GOSD (GO+) и без него (GO-) в присутствии 0, 4, 6 и 8 мМ растворов солей желчных кислот

| Время | GO+, | GO-, | GO+, | GO-, | GO+, | GO-, | GO+, | GO-, |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 мМ | 0 мМ | 4 мМ | 4 мМ | 6 мМ | 6 мМ | 8 мМ | 8 мМ |
| 0:00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | |
|------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|
| 0:05 | 13% | 4% | 17% | 1% | 22% | 1% | 29% | 7% |
| 0:10 | 44% | 5% | 44% | 1% | 50% | 2% | 56% | 10% |
| 0:15 | 61% | 5% | 61% | 1% | 62% | 1% | 67% | 9% |
| 0:20 | 70% | 5% | 69% | 2% | 70% | 3% | 73% | 11% |
| 0:26 | 76% | 5% | 73% | 2% | 75% | 2% | 77% | 11% |
| 0:31 | 78% | 5% | 77% | 3% | 78% | 3% | 81% | 11% |
| 0:36 | 81% | 5% | 80% | 2% | 80% | 3% | 83% | 11% |
| 0:41 | 83% | 6% | 82% | 3% | 82% | 2% | 84% | 11% |
| 0:46 | 85% | 7% | 83% | 2% | 84% | 2% | 86% | 11% |
| 0:51 | 86% | 6% | 85% | 2% | 86% | 3% | 87% | 11% |
| 0:56 | 86% | 6% | 85% | 2% | 87% | 3% | 88% | 11% |
| 1:01 | 87% | 6% | 87% | 2% | 88% | 3% | 90% | 11% |
| 1:06 | 88% | 7% | 89% | 3% | 89% | 3% | 90% | 11% |

Вывод: обработка посредством GOSD позволяла спорам *Bacillus licheniformis* прорасти быстрее и преодолевать стрессовые воздействия различных уровней солей желчных кислот, которые могут встречаться в желудочно-кишечном тракте.

Пример 10. Средний рост трех повторностей *Bacillus licheniformis* с или без GOSD в определенной калий-фосфатной среде и 2% глюкозе.

GO+ споры штамма ENV 431 *Bacillus licheniformis* обрабатывали посредством GOSD (ранее описанной процедуры). В качестве контроля использовали GO-споры из такой же культуры, которые сушили распылением без помощи GOSD. Испытание на задержку роста осуществляли в минимальной солевой питательной среде, дополненной 2% глюкозы.

Среда.

Среду готовили посредством растворения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,26 г/л), MgCl_2 (0,81 г/л), CaCl_2 (0,15 г/л), NaCl (0,05 г/л) в дистиллированной воде и добавления 1 мл/л 1000× смеси микроэлементов (MnSO_4 (0,85 г/50 мл), ZnSO_4 (0,15 г/50 мл), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15 г/50 мл), тиамин-гидрохлорид (0,05 г/50 мл)). Приготовленный раствор заливали в колбы (90 мл/колба) и подвергали автоклавированию при 121°C на протяжении 40 мин. Перед засеиванием среду дополняли 4 мл стерилизованного фильтрацией раствора 25× фосфата калия (K_2HPO_4 (3,44 г/50 мл), KH_2PO_4 (2,81 г/50 мл)) и 2 мл 50×(100 г/200 мл) глюкозы до конечной концентрации 2%.

Рост клеток *Bacillus licheniformis*.

Количество использованных для засеивания спор определяли путем учета порошка GO- и GO+ спор. Концентрированные (1000×) суспензии спор штамма ENV 431 *Bacillus licheniformis* готовили посредством смешивания спор в стерильных сосудах смесителя с применением стерильной воды и добавляли в колбы со средой до концентраций, указанных в приведенной таблице ниже как 0 ч. Результаты подсчетов первичной культуры получали посредством осуществления разведений и определения количества микроорганизмов путем посева на чашках Петри смешанных суспензий спор. Для каждого образца спор готовили 3 колбы.

Колбы инкубировали при 30°C, 150 об/мин и выращивали на протяжении 48 ч. Образцы собирали и осуществляли определение количества микроорганизмов путем посева на чашках Петри через 24 и 48 ч.

Таблица 10

Средний рост трех повторностей *Bacillus licheniformis* с GOSD (GO+) или без GOSD (GO-) в среде с минимальным содержанием фосфата калия и 2% глюкозы. Показанные данные приведены в Кое/мл

| | 0 часов | 24 часа | 48 часов |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| B. licheniformis, GO- | 1,88x10 ³ | 2,20x10 ⁴ | 9,4x10 ⁴ |
| B. licheniformis, GO+ | 1,46x10 ³ | 7,95x10 ⁴ | 3,65x10 ⁵ |

Вывод: обработка GOSD значимо усиливала скорость прорастания и роста *Bacillus licheniformis*.

Пример 11. Рост *Bacillus licheniformis* спустя двухдневный период; сравнение обработок с или без GOSD в присутствии различных концентраций NaCl.

Среда.

Готовили mTSB, как описано выше, но с добавлением хлорида натрия (Amresco X190) для индукции осмотического стресса, при необходимости, так, чтобы конечные концентрации составляли 0, 0,5, 1,0 или 1,5 М (0, 29,22, 58,44 или 87,66 г/л соответственно). Среду нагревали, делили на аликвоты в кол-

бы и подвергали автоклавированию.

Агар для определения количества микроорганизмов путем посева на чашках Петри (PCA) (BD 247910) готовили в соответствии с инструкциями производителя: 23,5 г порошка, суспендированного в 1 л воды, довести до кипения с интенсивным перемешиванием, поделить на аликвоты в стеклянные сосуды и подвергнуть автоклавированию. По необходимости, сосуды со средой охлаждали в 45°C водяной бане. Согласно данным производителя порошок имел следующее содержание PCA на 1 л: панкреатический гидролизат казеина: 5,0 г; дрожжевой экстракт: 2,5 г; декстроза: 1,0 г; агар: 15,0 г.

Суспензии спор.

Порошки спор штамма ENV100 *Bacillus licheniformis*, обработанные или не обработанные посредством GOSD, суспендировали в стерильной воде с 0,1% Octosol SLS (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Долтон, Вирджиния) в стерильном сосуде смесителя. Споры суспендировали посредством перемешивания в течение 5-секундных интервалов на протяжении суммарно по меньшей мере 15 с или до тех пор, пока визуально споры не были полностью суспендированы, с последующими серийными разведениями в стерильной воде. Это осуществляли так, чтобы конечная концентрация в колбах с культурой составляла 1×10^2 Кое/мл.

Количественный анализ.

Колбы инкубировали при 37°C со встряхиванием на 150 об/мин на протяжении 28 ч ("1 день") или 50 ч ("2 дня"). Аликвоты из каждой колбы серийно разводили в чашках Петри с PCA, охлажденным до <45°C, заливали поверх, перемешивали вращательным движением и позволяли затвердеть. Слои со средой переворачивали и инкубировали на протяжении приблизительно 24 ч при 37°C. Подсчитывали колонии и рассчитывали концентрации на основании разведений. Образцы, объемом примерно 10 мкл, из каждой колбы также высевали штрихами на чашки с PCA для испытания на чистоту.

Таблица 11

Рост *Bacillus licheniformis*, обработанного посредством GOSD (GO+), под воздействием осмотического стресса от солевого раствора

| День | GO+ или - | Молярность | кое/мл |
|------|-----------|------------|----------|
| 1 | GO+ | 0 | 1,05E+06 |
| 1 | GO- | 0 | 7,33E+03 |
| 1 | GO+ | 0,5 | 3,60E+06 |
| 1 | GO- | 0,5 | 5,00E+06 |
| 1 | GO+ | 1,0 | 3,00E+05 |
| 1 | GO- | 1,0 | 2,31E+05 |
| 1 | GO+ | 1,5 | 1,22E+04 |
| 1 | GO- | 1,5 | 1,50E+02 |
| 2 | GO+ | 0 | 8,17E+06 |
| 2 | GO- | 0 | 4,90E+05 |
| 2 | GO+ | 0,5 | 7,03E+06 |
| 2 | GO- | 0,5 | 8,43E+06 |
| 2 | GO+ | 1,0 | 2,07E+06 |
| 2 | GO- | 1,0 | 3,50E+06 |
| 2 | GO+ | 1,5 | 4,33E+05 |
| 2 | GO- | 1,5 | 1,53E+02 |

Вывод: обработка GOSD значительно усиливала прорастание и рост *Bacillus licheniformis* под действием осмотического солевого стресса.

Пример 12. Протеазная активность штамма ENV 923 *Bacillus subtilis*.

Споры штамма ENV 923 *Bacillus subtilis*, обработанные посредством GOSD (GO+), как описано ранее, и не обработанные (GO-) применяли для испытания протеазной активности.

Среда.

При испытании протеазной активности для размножения клеток применяли среду с определенным химическим солевым составом (CDSM). Среду готовили посредством растворения компонентов основного раствора (г/л): $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 1,26г; L-глутаминовая кислота, 1,18 г; MgCl_2 , 0,81; CaCl_2 , 0,155 и 85% L-молочная кислота (0,530 мл/л), в дистиллированной воде и добавления 1 мл/л 1000× смеси микроэлементов (г/50 мл). Колбы с основным раствором (48 мл/колба) подвергали автоклавированию на протяжении

40 мин. Перед засеиванием добавляли 2 мл отдельно приготовленного, стерилизованного фильтрацией 25× буферного раствора с глюкозой (г/50 мл): MOPS, 11,6; KH_2PO_4 , 0,6; глюкозы, 4,5.

Выращивание клеток ENV923 *Bacillus subtilis*.

Количество используемых для засеивания спор определяли при помощи подсчета порошка GO- и GO+ спор. Концентрированные (1000×) суспензии спор штамма ENV923 *Bacillus subtilis* готовили посредством смешивания спор в стерильных сосудах смесителя с применением стерильного 0,01 М буфера на основе фосфата калия, pH 7,0, и добавляли в колбы в концентрации, составлявшей приблизительно 1×10^4 Кое/мл. Результаты подсчета первичной культуры подтверждали посредством осуществления разведений и определения количества микроорганизмов путем посева на чашках Петри смешанных суспензий спор. Для каждого образца спор готовили 3 колбы.

Колбы инкубировали при 30°C, 150 об/мин и забирали образцы через 48 ч.

Анализ протеазной активности.

Анализ протеазной активности осуществляли на клеточных надосадочных жидкостях с применением казеина в качестве субстрата и фенолового реактива Фолина-Чокальтеу, который вступает в реакцию с тирозином и способствует развитию голубой окраски. Единицу протеазной активности определяли как количество фермента, которое высвобождает 1 мкг тирозина за 1 мин. Количество тирозина в тестовых пробирках определяли посредством измерения OD_{650} в спектрофотометре Jenway 7305 и расчета высвобожденного тирозина при помощи калибровочной кривой.

Реактивы.

Реактив 1: 0,05 М буфер на основе фосфата калия, pH 7,0.

0,1 М буфер на основе фосфата калия, pH 7,0 (приготовленный, как описано в примере 1), разводили до соотношения 1:1 дистиллированной водой с получением 0,05 М буфера на основе фосфата калия, pH 7,0.

Реактив 2: 0,65% раствор казеина.

0,65 г казеина растворяли в 80 мл 0,05 М буфера на основе фосфата калия, pH 7,0, подогревали для перехода казеина в раствор и конечный объем доводили до 100 мл при помощи 0,05 М буфера на основе фосфата калия, pH 7,0.

Реактив 3. 15% трихлоруксусная кислота (TCA).

15 г TCA растворяли в дистиллированной воде и конечный объем доводили до 100 мл.

Реактив 4. 20% Na_2CO_3 .

20 г Na_2CO_3 растворяли в дистиллированной воде и конечный объем доводили до 100 мл.

Протеазный анализ.

Центрифугировали 10 мл культуры и надосадочную жидкость фильтровали через 0,2-мкм фильтр в стерильные пробирки.

Смешивали 3 мл фильтрованной надосадочной жидкости с 3 мл 0,65% раствора казеина и помещали в 37°C водяную баню на 1 ч.

Реакцию останавливали посредством добавления 6 мл 15% TCA и образцы центрифугировали в течение 5 мин.

Смешивали 0,5 мл каждого образца с 1 мл 20% Na_2CO_3 , с последующим добавлением 0,5 мл фенолового реактива Фолина-Чокальтеу и инкубированием в течение 20 мин при комнатной температуре для обеспечения развития голубой окраски.

К каждому образцу добавляли 3 мл дистиллированной воды и после перемешивания измеряли OD_{650} .

Для расчета протеазной активности строили калибровочную кривую для тирозина путем получения серии разведений тирозина, растворенного в дистиллированной воде, обработки их такими же условиями, как и для образцов культуры, и измерения OD_{650} .

Таблица 12
Получение протеазы *Bacillus subtilis*, обработанного GOSD (GO+), по сравнению с контролем (GO-)

| <i>Bacillus subtilis</i> | | Единицы протеазной активности |
|--------------------------|-----|-------------------------------------|
| 54 ч. | GO+ | 71,5 |
| | GO- | 40 |

Вывод: обработка спор *Bacillus subtilis* посредством GOSD позволяла получить больше таких ферментов, как протеаза.

Пример 13. Прорастание *Streptomyces viridochromogenes* в присутствии способствующих прорастанию соединений.

Споры *Streptomyces viridochromogenes* собирали со слоев со средой посредством выливания 10 мл

буфера ТХ (0,05 М Tris-HCl буфер, рН 7,3 с 0,001% Tween 80) и удаления спор стерильным ватным тампоном. Суспензии спор со слоев со средой наливали в стерильные 50-мл пробирки. После получения суспензий спор из всех образцов осуществляли тепловой шок посредством размещения пробирок с суспензиями спор в термоблоке, позволяя температуре достигнуть 55°C и поддерживая температуру на уровне 55°C в течение 10 мин. После теплового шока суспензии спор охлаждали в ледяной воде в течение 5 мин и осаждали центрифугированием в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливали, споры ресуспендировали в 25 мл 0,02 М буфера на основе фосфата калия, рН 7,0, при 4°C и осаждали центрифугированием в течение 15 мин. После слива надосадочной жидкости споры ресуспендировали в 20 мл 0,02 М буфера на основе фосфата калия, рН 7,0, и интенсивно перемешивали с получением суспензии спор, которую применяли в эксперименте.

Образцы готовили посредством смешивания 1,5 мл 2× смеси вызывающего прорастания вещества с 1,5 мл суспензии спор. Все смеси вызывающих прорастание веществ готовили в дистиллированной воде в виде 2×50 мл растворов. Хлорид кальция готовили в виде 100× раствора (0,4 г/10 мл) и 20 мкл добавляли к 10 мл 2× смесей вызывающих прорастание веществ. Конечные концентрации способствующих прорастанию соединений были следующими: 0,89 мг/мл L-аланина, 1,17 мг/мл L-валина, 13,2 мг/мл L-аспарагина, 2,25 мг/мл глюкозы и 2,25 мг/мл фруктозы. После измерения исходного O.D.600 образцы переносили в 30°C водяную баню и измеряли O.D.600 с 15-минутными интервалами в течение 90 мин для определения скоростей прорастания.

Таблица 13

% уменьшения оптической плотности ENV 151 (*Streptomyces viridochromogenes*)

| Обработка | ион/вызывающее прорастание вещество | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 |
|---|-------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0,01 М КРО ₄ | | 0 | 1,0% | 2,0% | 5,4% | 6,2% | 4,9% | 5,4% |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ | | 0 | 7,3% | 3,4% | 6,1% | 6,1% | 8,0% | 9,3% |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Ala | | 0 | 1,8% | 5,2% | 12,2% | 11,9% | 14,2% | 17,6% |
| | | | | | % | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Val | | 0 | 2,0% | 4,9% | 11,2% | 7,8% | 14,4% | 18,0% |
| | | | | | % | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Asn | | 0 | 2,0% | 6,1% | 8,8% | 11,7% | 8,0% | 9,0% |
| | | | | | | % | | |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn | | 0 | 7,7% | 12,1% | 14,4% | 19,8% | 20,4% | 18,6% |
| | | | | % | % | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn, глюкоза | | 0 | 8,2% | 11,7% | 14,5% | 20,1% | 19,4% | 20,7% |
| | | | | % | % | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , глюкоза | | 0 | 7,0% | 8,8% | 7,0% | 10,5% | 12,6% | 13,2% |
| | | | | | | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , глюкоза, фруктоза | | 0 | 5,9% | 8,3% | 12,0% | 12,7% | 14,6% | 14,6% |
| | | | | | % | % | % | % |
| 0,01 М КРО ₄ , CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn, глюкоза, фруктоза | | 0 | 11,7% | 14,0% | 17,7% | 20,4% | 22,2% | 22,4% |
| | | | % | % | % | % | % | % |

Вывод: обработка спор *Streptomyces viridochromogenes* способствующими прорастанию соединениями усиливала прорастание.

Пример 14. Сравнение скоростей прорастания однородных смесей и традиционной смеси бактериальных спор со способствующими прорастанию соединениями.

Для того чтобы сравнить скорость прорастания спор однородных смесей со скоростью прорастания спор, традиционно смешиваемых с вызывающим прорастание веществом, проводили описанные далее обработки.

А. Получение однородной смеси.

Высушивали споры *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindensis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* и *Streptomyces aureofaciens*, при этом в споровую массу непосредственно перед высушиванием вносили L-аланин, L-валин, L-пролин, L-лейцин, L-цистеин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин или L-фенилаланин в виде раствора, содержавшего 0,044 г аминокислоты на 1 мл дистиллированной воды. Полученную однородную смесь проращивали посредством последующего внесения в раствор, состоявший из 0,01 М фосфат-

ного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7.

В. Традиционное смешивание спор с вызывающим прорастание веществом. Гидратировали и высушивали споры *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* и *Streptomyces aureofaciens*. Такие споры проращивали посредством внесения в раствор, состоявший из 0,01 М фосфатного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7 и 0,0001 г L-аланина, L-валина, L-пролина, L-лейцина, L-цистеина, L-треонина, L-глутамин, L-аспарагина или L-фенилаланина на 1 мл раствора.

С. Прорастание спор самих по себе.

Гидратировали и высушивали споры *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* и *Streptomyces aureofaciens*. Затем споры вносили в раствор, состоявший из 0,01 М фосфатного буфера в дистиллированной воде с итоговым рН 7.

Прорастание спор, полученное для каждой такой обработки, измеряли по проценту снижения оптической плотности или посредством подсчета числа проросших спор под микроскопом. Было обнаружено, что однородно перемешанные композиции способствовали более быстрому прорастанию, чем их соответствующий традиционно смешанный эквивалент.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Высушенная смесь для повышения прорастания бактериальной споры, содержащая бактериальную споры и выделенную L-аминокислоту, причем L-аминокислота адсорбирована на бактериальной споры или абсорбирована бактериальной спорой.

2. Смесь по п.1, причем спора принадлежит бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Bacillus alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenticus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* и *Streptomyces spp.*

3. Смесь по п.1, причем L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-аланина, L-валина, L-пролина, L-лейцина, L-цистеина, L-треонина, L-глутамин, L-аспарагина и L-фенилаланина.

4. Смесь по п.1, представляющая собой смесь, выбранную из группы, состоящей из L-аланин + *Bacillus subtilis*, L-аланин + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + *Bacillus pumilus*, L-аланин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + *Bacillus coagulans*, L-аланин + *Bacillus cereus*, L-аланин + *Bacillus clausii*, L-аланин + *Clostridium butyricum*, L-валин + *Bacillus subtilis*, L-валин + *Bacillus licheniformis*, L-валин + *Bacillus pumilus*, L-валин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-валин + *Bacillus coagulans*, L-валин + *Bacillus cereus*, L-валин + *Bacillus clausii*, L-валин + *Clostridium butyricum* и L-пролин + *Bacillus megaterium*.

5. Смесь по п.1, полученная посредством распылительной сушки, сублимационной сушки, воздушной сушки или сушки в барабанной сушилке.

6. Смесь по п.1, причем спора принадлежит бактерии, выбранной из группы, состоящей из *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *B. pumilus*, а L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-аланина, L-валина и L-аспарагина.

7. Композиция, содержащая высушенную смесь по любому из п.п.1, 2, 5 и 6 и по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из питательного вещества, поверхностно-активного вещества и эмульгатора.

8. Композиция по п.7, причем спора принадлежит бактерии, выбранной из группы, состоящей из *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenticus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B.*

weihenstephanensis, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* и *Streptomyces* spp.

9. Композиция по п.7, представляющая собой смесь, выбранную из группы, состоящей из L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus subtilis*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus pumilus*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus coagulans*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus cereus*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus clausii*, L-аланин + глюкоза+фруктоза+калий + *Clostridium butyricum*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus subtilis*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus licheniformis*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus pumilus*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus coagulans*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus cereus*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Bacillus clausii*, L-аспарагин + глюкоза+фруктоза+калий + *Clostridium butyricum*, L-аланин + инозин + *Bacillus subtilis*, L-аланин + инозин + *Bacillus licheniformis*, L-аланин + инозин + *Bacillus pumilus*, L-аланин + инозин + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-аланин + инозин + *Bacillus coagulans*, L-аланин + инозин + *Bacillus cereus*, L-аланин + инозин + *Bacillus clausii*, L-аланин + инозин + *Clostridium butyricum*, L-пролин + глюкоза + *Bacillus megaterium* и L-лактат + *Clostridium butyricum*.

10. Пробиотический продукт, содержащий высушенную смесь по п.1 и энтеросолюбильное покрытие.

11. Способ получения высушенной смеси по любому из пп.1, 2, 5 и 6, причем способ включает:

- a) получение раствора, содержащего бактериальные споры и выделенную L-аминокислоту; и
- b) высушивание раствора с получением высушенной смеси, содержащей бактериальную споры и L-аминокислоту.

12. Способ по п.11, причем сушка представляет собой распылительную сушку, сублимационную сушку, воздушную сушку или сушку в барабанной сушилке.

13. Высушенная смесь, полученная способом по п.11.

14. Способ повышения прорастания бактериальных спор, включающий воздействие на высушенную смесь по п.13 активирующей средой, благоприятствующей прорастанию бактериальных спор.

15. Способ по п.14, причем процент прорастания бактериальных спор в смеси повышается по меньшей мере на 10% по отношению к соответствующему составу с бактериальными спорами, в котором отсутствует L-аминокислота.

16. Способ по п.14, причем сушка представляет собой распылительную сушку, сублимационную сушку, воздушную сушку или сушку в барабанной сушилке.

