

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992374** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2020.05.28**

**(51)** Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)  
*C05F 11/08* (2006.01)  
*A01N 63/02* (2006.01)  
*C12R 1/07* (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.05.22**

---

**(54) BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS QV15 - СТИМУЛЯТОР ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДЛЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИНГИБИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ЭКСТРАКТОВ МАЛИНЫ И КЛУБНИКИ ОТНОСИТЕЛЬНО ФЕРМЕНТОВ, СВЯЗАННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

---

**(31)** P201730818

**(32)** 2017.06.21

**(33)** ES

**(86)** PCT/ES2018/070369

**(87)** WO 2018/234599 2018.12.27

**(71)** Заявитель:

**ФУНДАСЬОН УНИВЕРСИТАРИА  
САН-ПАБЛО (ES)**

**(72)** Изобретатель:

**Гутьеррес Альбанчес Энрике,  
Гутьеррес Маньеро Франциско  
Хавьер, Лукас Гарсия Хосе Антонио,  
Рамос Солано Беатрис (ES)**

**(74)** Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

**(57)** Штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), микроорганизм из группы грамм-положительных бактерий рода *Bacillus*, стимулятор вторичного метаболизма фенольных соединений, усилитель экстрактов из плодов малины и клубники и листьев для ферментов, связанных с регуляцией глюкозы в крови (альфа-глюкозидаза), гипертонией (ангиотензинпревращающий фермент, АСЕ) и воспалением (циклооксигеназа, СОХ2). Этот штамм был выделен из ризосферы сосны обыкновенной в питательном агаре (РСА) и был охарактеризован с морфологической, биохимической и генетической точек зрения секвенированием гена *16s*. Его можно применять для улучшения свойств экстрактов касательно их применения к ферментам, связанным с метаболическим синдромом, или для того, чтобы модифицировать вторичный метаболизм для усиления фенольных соединений у видов растений агрономического, фармакологического и пищевого назначения, а также для получения большего количество активных веществ и/или новых продуктов питания со стандартизованным содержанием фенола.

---

**A1**

**201992374**

**201992374**

**A1**

***BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* QV15 – СТИМУЛЯТОР ВТОРИЧНОГО  
МЕТАБОЛИЗМА ДЛЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ФЕНОЛЬНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ И ИНГИБИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ЭКСТРАКТОВ МАЛИНЫ И  
КЛУБНИКИ ОТНОСИТЕЛЬНО ФЕРМЕНТОВ, СВЯЗАННЫХ С  
МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

**ОПИСАНИЕ**

***Bacillus Amyloliquefaciens* Qv15 – стимулятор вторичного метаболизма для вторичного метаболизма фенольных соединений и ингибирующей способности экстрактов малины и клубники относительно ферментов, связанных с метаболическим синдромом.**

Данное изобретение относится к штамму *Bacillus amyloliquefaciens* (QV15, лабораторный внутренний код) для применения в растениях с целью улучшения синтеза фенольных соединений вторичного метаболизма, представляющих интерес для сельского хозяйства, фармакологии или питания, а именно для улучшения окраски клубники и плодов малины, кроме улучшения свойств экстрактов малины и клубники для ингибирующего действия на альфа-глюкозидазу, ACE и COX2 для улучшения симптомов или предотвращения метаболического синдрома.

После выделения этому штамму был присвоен внутренний номер L81, он был депонирован для патентных целей в Испанской коллекции типовых культур (CECT) 31 мая 2017 года, где ему был присвоен номер 9371. CECT расположен в исследовательском здании Университета Валенсии, в кампусе Burjassot (DP 46100 - Валенсия, Испания).

Этот бактериальный штамм может служить основой для приготовления различных типов стимулирующих продуктов вторичного метаболизма растений, представляющих сельскохозяйственный, фармакологический и пищевой интерес, а также для получения большего количества активных веществ и/или новых продуктов питания со стандартизованным содержанием фенола, таких как лесные ягоды (клубника и малина) с повышенным содержанием фенольных соединений, в частности антоцианов, улучшающих окраску и Вгіх. Эти продукты должны повышать содержание фенольных биоактивных веществ, которые могут представлять собой активные вещества для различных лекарств, и улучшать качество определенных продуктов питания. Кроме того, это может применяться для улучшения свойств экстрактов ежевики, малины и клубники для ингибирующего воздействия на альфа-глюкозидазу и COX2 для улучшения метаболического синдрома.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к области биотехнологии, фармакологии и новых продуктов питания.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Механизмы действия бактерий, стимулирующих рост растений, можно обобщить на два типа: прямые, когда продуцируемые метаболиты нарушают метаболизм растений (гормональная активность, защитные механизмы стимуляции ...), и косвенные, когда они синтезируют соединения, способствующие поглощению или мобилизации питательных веществ, или они предотвращают рост патогенных микроорганизмов, не затрагивая растение, не нарушая метаболизм растения.

В этом случае актуален один из прямых механизмов, то есть тех, которые нарушают метаболизм растений. Растение обладает вторичным метаболизмом, высоко индуцируемым, связанным с защитой растения и адаптацией к неблагоприятным ситуациям, с которыми ему приходится сталкиваться. В рамках этого вторичного метаболизма мы можем обнаружить метаболизм фенольных соединений, который, помимо того, что связан с защитой растений, представляет собой проблему для здоровья человека, как при потреблении продуктов растительного происхождения, в которых они содержатся в природе, так и растительных экстрактов для пищевых добавок. Они также важны в качестве источника активных веществ для получения лекарств. Источником углеродных скелетов для подпитки вторичного метаболизма является фотосинтез, и любой механизм, который может повлиять на этот процесс, повлияет на здоровье растений.

*Bacillus amyloliquefaciens* относится к группе грамм-положительных бактерий. Род *Bacillus* распространен у почвенных бактерий, они могут быть патогенными микроорганизмами для животных и растений. Следуя таксономии *Manual Bergeys*, издание за март 2001 года, эта бактерия относится к надцарству *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, подклассу *Bacillales*, семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, видам *Bamyloliquefaciens*. Род *Bacillus* очень распространен в почвенной системе и неоднократно описывался как защитная бактерия от различных болезней растений. Они могут образовывать нефлуоресцентные сидерофоры катехинового типа, которые, помимо других функций, действуют как молекулы, способные захватывать железо в среде для метаболизма микроорганизмов. Наличие *Bacillus*

*sp.* в ризосфере различных растений благотворно влияет на их физиологию, а это означает, что их отбор, скорее всего, произойдет на уровне ризосферы.

В научной литературе имеется много ссылок, в которых говорится, что штаммы рода *Bacillus* способны выполнять многочисленные функции, представляющие интерес в области биотехнологии, сельского хозяйства и фитопатологии. В области биотехнологии проводятся исследования i) их роли в качестве биомаркеров для стерилизации, в исследованиях биозащиты, ii) их влияния на первичный метаболизм растений путем увеличения их роста и производства, iii) их роли в качестве дезинфицирующих агентов, iv) их роли в качестве антимикробных агентов благодаря их способности продуцировать антимикробные молекулы поликетидного или липопептидного типа. В области сельского хозяйства и фитопатологии имеется много упоминаний о способности *Bacillus amyloliquefaciens* стимулировать защиту растений; с другой стороны, существуют штаммы, способные продуцировать хитиназы и глюканы, непосредственно защищающие от *Alternaria* у грибов *Fusarium*. Имеются также упоминания о штаммах рода *Bacillus*, способных защищать от солевого стресса и против листового патогена *Pseudomonas syringae* DC3000 (Barriuso et al, 2008 *Phytopathology*), но нет сведений о *Bacillus amyloliquefaciens*. Наконец, не существует штамма *Bacillus* или *Bacillus amyloliquefaciens* для модуляции пути биосинтеза фенолпропаноидов, флавоноидов и антоцианов, что увеличивает концентрацию полифенолов, в частности флавонолов и антоцианов.

С другой стороны, широко известно, что богатые флавоноидами растительные экстракты, антоцианы и другие фенольные соединения обладают высокой антиоксидантной активностью, полезной для здоровья. Экстракты из видов черники часто упоминаются в качестве полезных продуктов благодаря их антиоксидантной активности, нейродегенеративной профилактике, профилактике потери костной массы, коронарной профилактике и противораковым эффектам. Экстракты ягод, как диких, так и коммерческих видов, также связаны с гипогликемической активностью, ингибированием адипогенеза, улучшением факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, противовоспалительной активностью и способностью вызывать чувство сытости и противодействовать избыточному весу. В недавней статье Lila, MA (*Functional Foods in Health and Disease*, 2011, 2: 13-24, Page 13 of 24), обсуждается влияние биофлавоноидов из ягод на биомаркеры метаболического синдрома, связанные с диабетом, избыточным весом или ожирением и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В этой области растительных экстрактов с пользой для здоровья, две другие недавние статьи известных исследователей, *Sharma, Kumar (Journal of Diabetology, June 2011; 2:4)* и *Kaume, Howard, Devareddy (J.10 Agric. Food Chem. 2012, 60, 5716–5727)*, точно отражают уровень техники, более близкий к предмету настоящего изобретения, в том смысле, что плоды ежевики (*Rubus sp. var Loch Ness*), благодаря своим высоким уровням упомянутых фенольных соединений были связаны, среди прочих функций, с понижающей глюкозу активностью и способностью вызывать чувство сытости и противодействовать избыточному весу. На самом деле в статье *Sharma* и *Kumar* рассматривается антидиабетическое действие экстрактов плодов *Rubus ellipticus* на мышей, вызванных диабетом с использованием алоксана, хотя стоит отметить отсутствие исследований на здоровых мышах и нормальных животных.

Следовательно, исходя из этой линии исследований, команде изобретателей удалось приготовить метанольные экстракты из клубники и малины, полученные из растений, обработанных *Bacillus amyloliquefaciens* QV15, в течение всего цикла биологического производства. Эти экстракты прекрасно характеризуются по своему составу и антиоксидантной способности и, как было показано, обладают большей способностью ингибировать ферменты – альфа-глюкозидазу, АСЕ и СОХ2, что делает их потенциально полезными при приготовлении пищевых препаратов и лекарственных средств для профилактики и улучшения симптомов, связанных с метаболическим синдромом.

Проведение ретроспективного поиска патентов по всему миру в испанской производственной базе данных *Invenet (SPTO)* и в международном *Worldwide* с использованием системы *Esp@cenet* подтверждает вывод, сделанный на основе консультаций по научной литературе: хотя существует ссылка, аналогичная штамму *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (ES 2 336 758 B1), но отсутствуют патентные документы, относящиеся к бактериальному виду *Bacillus amyloliquefaciens*, поддерживающему способность стимулировать вторичный метаболизм, в частности, путь фенолпропаноидов, флавоноидов и антоцианов. Таким образом, он способен изменять метаболический профиль растения и, следовательно, пользу для здоровья, которую могут иметь фрукты или экстракты, приготовленные из этого растительного материала.

После вышеупомянутого исследования было обнаружено, что во всем мире опубликованы патенты, относящиеся к штамму *Bacillus amyloliquefaciens*, но ни один из них не связан со способностью модулировать метаболический профиль плода на уровне фенольного соединения, в пути флавоноидов и антоцианов, этот глобальный эффект

является предметом настоящего изобретения. Большинство патентов относятся к защите культуры посредством бактериальной продукции ферментов (глюканаз, хитиназ и т. д.), которые оказывают защитное действие при высвобождении вне клетки, на почвенном или листовом уровне (косвенный механизм) и не затрагивают метаболизм растения в этой защите (прямой механизм).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

С учетом предшествующего уровня техники понятно, что предмет изобретения, описанного в настоящем документе, соответствует условиям новизны и изобретательского уровня, необходимым для патентования, и заключается в выделении и характеристике бактериального штамма *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), который представляет собой микроорганизм из группы грамм-положительных бактерий рода *Bacillus*, способный модулировать вторичный метаболизм и усиливать свойства растительных экстрактов для ферментов, связанных с метаболическим синдромом (СОХ2, АСЕ и альфа-глюкозидазы).

Физиологические характеристики и генетический анализ этого штамма позволяют однозначно идентифицировать его, дифференцируя его от других видов рода *Bacillus*.

После выделения и характеристики с внутренним ссылочным кодом L81 были проведены различные тесты для выявления потенциала этой бактерии. Это продуцирование ауксинов, деградация 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата, солубилизация фосфатов и продуцирование сидерофоров и хитиназ, что положительно сказывается на продуцировании сидерофоров.

До настоящего времени были проведены последовательные эксперименты по инокуляции бактериальных суспензий *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 на *Arabidopsis thaliana*, улучшающих фотосинтез (фPSII / NPQ), не влияющих на рост растений. В этих экспериментах было обнаружено увеличение активности SOD и снижение активности APX и остальной активности по удалению ROS, а также умеренное увеличение активности растения в отношении глюканазы (PR2) и хитиназы (PR3). Когда эти растения, ранее инокулированные QV15, подвергались шоку с помощью *Xanthomonas campestris pv tomato*, растения выдерживали эту атаку гораздо лучше, обеспечив защиту на 60 %, что связано с более чем двукратным увеличением по сравнению с контролем в активности PR2 и PR3.

С другой стороны, полевые опыты были проведены на растениях ежевики (*Rubus var Loch Ness*), малины (*Rubus idaeus*) и клубники (*Fragaria vesca*) в производственных теплицах. QV15 вносили на корневом уровне, с сентября по февраль, каждые 15 дней, в условиях межсезонного производства. Увеличение синтеза фенольных соединений обнаружено во всех из них; в ежевике это увеличение контролируется на уровне факторов транскрипции, стимулирующих транскрипцию MYB6, и некоторых генов пути биосинтеза флавонола.

Эти эксперименты, проведенные на разных видах растений, показывают, что *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 способен модулировать вторичный метаболизм растений, а также улучшать свойства экстрактов плодов малины и клубники, улучшая ингибирующее действие альфа-глюкозидазы, ACE и COX2 в сравнении с неинокулированными контролями и, следовательно, эта бактерия или любая полученная из нее молекула может применяться в любом типе культур агрономического, фармакологического или пищевого, сельскохозяйственного или лесного назначения для улучшения симптомов или предотвращения метаболического синдрома.

*Bacillus amyloliquefaciens* QV15 можно применять для растений ежевики (*Rubus var Loch Ness*), малины (*Rubus idaeus*) и клубники (*Fragaria vesca*) путем изменения содержания фенольных соединений в листьях и плодах, особенно флавонолов, антоцианинов и производных катехинов. В листьях ежевики он действует на уровне факторов транскрипции, а также в некоторых генах пути биосинтеза флавонолов и антоцианов и, таким образом, изменяет метаболический профиль (флавонолы и производные) в листьях. В плодах ежевики он также действует на уровне транскрипционных факторов и в некоторых генах пути биосинтеза флавонолов и антоцианов. Это может быть применено к любым видам растений, включающим красные ягоды или дикие фрукты, такие как клубника, малина, ежевика или черника, или виноград, чтобы увеличить в них содержание фенольных соединений, представляющих фармакологический, пищевой интерес, особенно в малине и клубнике для улучшения содержания антоцианов и, как следствие, их окраски.

Вышеупомянутые эксперименты по применению *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 в качестве стимулятора вторичного метаболизма фенольных соединений, в частности антоцианов в клубнике и малине, а также для улучшения экстрактов под действием альфа-глюкозидазы, ферментов ACE и COX2 представлены в конце этого описания, в разделе варианты осуществления.

Цель, которая, в конечном счете, преследуется этим изобретением и которая составляет техническое преимущество, обеспечиваемое им, состоит в поиске бактерий, которые стимулируют вторичный метаболизм фенольных соединений в растениях агрономического, фармакологического и пищевого назначения, с достижением двойного эффекта: с одной стороны для улучшения содержания антоцианов в клубнике и малине и, следовательно, их коммерческой ценности, а с другой стороны, для получения растительного сырья – источника улучшенных экстрактов в сравнении с неинкулированными контролями для их влияния на альфа-глюкозидазу, ферменты ACE и COX2 и, следовательно, для возможности их применения для улучшения симптомов или предотвращения метаболического синдрома.

Соответственно, в настоящей заявке на патент заявлено применение штамма *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 или любой его фракции для применения в растениях любого типа как части какого-либо препарата или индивидуально, или в комбинации с другими организмами, для стимулирования вторичного метаболизма фенольных соединений в растениях, представляющих агрономический, фармакологический и пищевой интерес, и в то же время для улучшения экстрактов, полученных из растительного материала, обработанного штаммом, на активность альфа-глюкозидазы, ACE и COX2.

## ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изучая ризосферу двух видов *Pinus*, представляющих интерес в качестве лесных насаждений, мы нашли штаммы рода *Bacillus*, рассматриваемых в данном документе.

Штаммы были выделены из ризосферы природной популяции *Pinus pinea L.* во время изолирования бактерий, проведенном из ризосферы двух видов сосны (*Pinus pinaster Aiton* и *Pinus pinea L.*) и микосферы микоризного гриба, связанного с ними, *Lactarius deliciosus* (Fries) S.F. Gray., осенью 2000 г., совпадающим с периодом плодоношения *Lactarius deliciosus*, в Сьерра-де-Арасена (Уэльва, Испания). В результате этого было отобрано 720 штаммов, включая *Bacillus amyloliquefaciens* (QV15, внутренний лабораторный код). Выделение указанного штамма проводили на питательном агаре (PCA).

В лаборатории этот микроорганизм поддерживается с высокой степенью выживаемости в 20 % растворе глицерина в питательном бульоне (Pronadisa) при -80 °C или в 15 % растворе глицерина в воде при -20 °C и легко восстанавливается в культуральной среде, используемой для выделения как в твердой фазе, так и в жидкой фазе при 28 °C.

Для характеристики штамма были рассмотрены различные фенотипические признаки, которые подробно описаны в данном описании: (i) морфология колонии (ii) морфология клетки, (iii) секвенирование гена рибосомальной ДНК, соответствующей субъединице 16S. iv) секвенирование генома

Морфологические, биохимические и генетические характеристики QV15.

Таксономическую характеристику *Bacillus amyloliquefaciens* проводили путем идентификации штамма с использованием частичного секвенирования рибосомальной ДНК 16S, ее сравнение с последовательностями в базах данных выявило 100 % гомологию со штаммом *Bacillus amyloliquefaciens*.

Далее морфологию колонии уточняли при 24-часовой инкубации при 28 °C на стандартных агарах (РСА).

Таблица 1

QV15	
Размер колонии	< 1 ммØ
Форма	круглая
Контур	гладкий
Прозрачность	нет
Консистенция	кремовая
Цвет	темно-желтый

При выращивании в жидких средах (Lennox Pronadisa) цвет среды изменяется до более темного желтого от экспоненциальной фазы роста до стационарной фазы роста.

Морфологические признаки *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 при 24-часовой инкубации при 28 °C на стандартном агаре (РСА) соответствуют спорулированной грамм-положительной бацилле.

Затем был проведен генетический анализ штамма для идентификации, для этого были выполнены следующие шаги:

Экстракция ДНК.

Для выделения ДНК колонии выращивали в течение 24 часов в Леннокс (Pronadisa) при 28 °С при перемешивании. По истечении этого времени геномную ДНК каждой бактерии экстрагировали с помощью набора для выделения микробной ДНК Ultraclean™ (MoBio, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

Аmplификация 16s рДНК.

1500 пар оснований, соответствующие этому участку, были амплифицированы с помощью ПЦР со следующими праймерами: прямой 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' и обратный 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Ulrike, 1989) в реакции, проведенной в 25 мкл с 1X-10X буфера, 2,5 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мкМ каждого DNTP, 2,5 мкМ прямого праймера, 2,5 мкМ обратного праймера, 1,25 единицами ДНК-полимеразы (AmpliTaq Applied) и 100 нг бактериальной ДНК. Амплификацию выполняли в термоциклере GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) при следующих условиях: при 95 °С, в течение 5 минут, затем 25 циклов при 94 °С в течение 30 секунд, 65,5 °С в течение 30 секунд и при 72 °С в течение 30 секунд, заканчивая 7 минутами при 72 °С.

Гелевая визуализация.

Продукт ПЦР повторно растворяли в 1 % агарозном геле (вес/объем) в буфере трис-ацетат-ЭДТА (1 % ТАЕ) с бромидом этидия (0,5 мг/мл) и визуализировали на анализаторе изображений GelDoc2000™ 170-8126 (BioRad, Калифорния, США).

Секвенирование ДНК.

После подтверждения амплификации, продукт ПЦР очищали с помощью набора для очистки ДНК UltraClean™ PCR Cleanup (MoBio, CA, USA), его секвенировали в секвенаторе ABI PRIMS® 377 ADN (Applied Biosystems, CA, США).

Компьютерный анализ последовательностей.

Последовательности были выровнены с помощью программы редактора Bioedit Sequence Aligment 5.0.3.®, были вручную рассмотрены, исправлены и проанализированы с помощью BLASTN 2.2.6 (Altschul et al., 1997) в GeneBank EMBL и DDBJ (веб-сайт NCBI BLASTR: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), что выразилось в наивысшей гомологии: ген рибосомальной

РНК *Bacillus amyloliquefaciens* QV15, полная последовательность, последовательность депонирована в GeneBank под инвентарным номером AY307364.1

*Bacillus amyloliquefaciens* как усилитель адаптации к стрессовым условиям и стимулятор первичного и вторичного метаболизма фенольных соединений.

Первый пример. Эксперимент по выявлению проростков *Arabidopsis thaliana* путем двукратной инокуляции бактерий на уровне корней, на четвертой и пятой неделях после прорастания семян. Через три дня после второй инокуляции возбудитель (*Xantomonas campestris*) инокулировали на листовном уровне путем распыления патогена. Фотосинтез определяли по флуоресценции (Fo, Fv/Fm, фPSII и NPQ), ферментативным активностям (цикл поглощения ROS и защитные ферменты) и относительному индексу заболевания. Наблюдалось: i) увеличение активности SOD и снижение APX, ii) увеличение активности глюканаз, хитиназ и целлюлаз при обработке QV15 + патоген, в то время как с QV15 сохраняется аналогичная или более низкая активность в сравнении с контролем, что демонстрирует индукцию системной защиты; iii) снижение симптоматики заболевания, вызванного атакой возбудителя, на 63,61 %.

Второй пример. Эксперимент по выявлению растений *Rubus var Loch Ness* с нанесением бактерий в корни. Бактериальную суспензию штамма QV15 вносили в корень растений *Rubus var Loch Ness* каждые две недели (с сентября 2014 года по февраль 2015 года) после пересадки. Фотосинтез определяли по флуоресценции (Fo, Fv/Fm, ФPSII и NPQ), ферментативной активности (цикл ROS и защитные ферменты), биоактивности листьев (общее количество фенолов, флавонолов и антоцианов), хлорофиллов в двух моментах отбора проб (цветение и максимальное плодоношение); при максимальном плодоношении определяли параметры питания (рН, °Brix и % лимонной кислоты) и биологически активные соединения в плодах; изучали экспрессию генов пути флавоноидов и защитных белков в листьях и плодах, собранных при плодоношении; и наконец, были проведены измерения с экстрактами фруктов по поводу ингибирования ферментов, связанных с регуляцией глюкозы (альфа-амилаза и альфа-глюкозидаза), по поводу гипертензии (ACE) и воспаления (COX2), ферментов, связанных с метаболическим синдромом. Наблюдалось: i) на уровне фотосинтеза увеличивается фPSII и уменьшается NPQ, ii) индукция активности SOD, снижается APX, iii) увеличение активности и экспрессии защитных белков (глюканаз и хитиназ) как в период цветения, так и в плодоношения, связанных с усилением защиты от патогенных микроорганизмов, особенно от плесени, iv) на уровне биологически активных компонентов в листьях при цветении наблюдается увеличение фенолов, хотя флавонолы и антоцианы не

нарушаются, а при плодоношении количества их всех уменьшаются в листьях, v) увеличение хлорофилла А, В и общего как при цветении, так и при плодоношении, vi) в плодах наблюдалось снижение количества фенолов, в то время как флавонолы и антоцианы не были нарушены, что указывает на изменение вторичного метаболизма vii) в плодах ежевики увеличивался антиоксидантный потенциал, viii) увеличение экспрессии генов пути флавонола и антоциана CHS, F3H, DFR, LAR и GST1 (у плодов и листьев), данные, которые совпадают с анализом биоактивных компонентов, и это предполагает отклонение от пути флавонола в направлении производства катехинов на промежуточных стадиях созревания.

Экстракты готовили из свежей ежевики и листьев сорта «Лох-Несс». Для экстрактов, применяемых для измерения влияния на альфа-глюкозидазу, АСЕ и СОХ<sub>2</sub>, ежевику сначала лиофилизировали, затем экстрагировали 80 % метанолом, центрифугировали и упаривали в вакууме органическую фракцию. Охарактеризован экстракт с 20 % воды; тогда как для экстрактов, используемых для остальных измерений, была проведена экстракция 80 % метанолом. Таким образом, измерения, полученные для альфа-глюкозидазы, АСЕ и СОХ-2, будут представлены в сухом весе, в то время как для остальных – в свежем весе.

Для характеристики экстракта были сделаны следующие определения:

Общее содержание фенолов экстракта определяли колориметрическим методом Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic* 10 16,144-158, в основе которого лежит окисление в основной среде гидроксильных групп фенолов реагентом Фолина-Чокалтеу. Результаты выражены в мг галловой кислоты/г экстракта. Таким образом, экстракты, полученные в соответствии с описанными ниже способами, имеют минимальное общее содержание фенола, составляющее 20 мг/г.

Общее содержание флавонола в экстракте определяют колориметрическим методом хлорида алюминия согласно Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559. Doi: 10.1016 / S0308-8146 (98) 00102-2 с изменениями. Оно выражается в эквиваленте мг катехина на грамм свежего экстракта.

Общее содержание антоцианина определяли методом дифференциального рН, описанным Giusti and Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001). *Anthocyanins Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy*. В: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed) *Current*

Protocols in Food Analytical Chemistry. New York, pp F121-F129. doi: 10.1002 / 0471142913.faf0102s00, который оценивает различную абсорбцию антоцианов при разных значениях pH. Результаты выражены в мг 30 цианидин-3-гликозида на грамм свежего экстракта.

Для измерения ферментативной активности, связанной с защитным и окислительным стрессом, использовали методы, описанные в Garcí-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, JA, Jiménez-Díz, RM, & Tena, M. (2002); Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(6), 325–337. Lee, B.-R., Jung, W. J., Lee, B.-H., Avice, J.-C., Ourry, A., & Kim, T. H. (2008); Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum*, 132(3), 329–337. Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, B., Raguchander, T., Suresh, S., & Samiyappan, R. (2008); *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leafhopper pest. *Journal of Applied Entomology*, 132(6), 469–479. Xu, C., Natarajan, S., & Sullivan, J. H. (2008); Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 39–48.

Для измерений хлорофилла использовался метод, описанный в Harmut K. Lichtenthaler и Claus Buschmann (2001). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F.4.2.1- F.4.2.1.

Третий пример. Эксперимент по выявлению растений малины (*Rubus idaeus* var *Adelita*) путем инокуляции бактерий на уровне корней каждые две недели, с октября 2015 года по май 2016 года, с анализом двух максимумов производства малины (январь и май). Фотосинтез определяли по флуоресценции (Fo, Fv/Fm, фPSII, у NPQ), биоактивными соединениям (фенолы, флавононы и антоцианы) в листьях и плодах, питательной ценности во фруктах (pH, °Brix и % лимонной кислоты); и, наконец, были проведены измерения с метанольными экстрактами плодов по поводу ингибирования ферментов, связанных с регуляцией глюкозы (альфа-амилаза и альфа-глюкозидаза), гипертензии (ACE) и воспаления (COX2), ферментов, связанных с метаболическим синдромом. У фруктов наблюдалось: i) увеличение °Brix, уменьшение количества лимонной кислоты, а также снижение pH, ii) увеличение количества антоцианов, фенолов и флавонолов в сравнении с контролем, iii) увеличение способности фруктовых экстрактов ингибировать альфа-глюкозидазу, ACE и COX 2. Содержание антоцианов, фенолов и флавонолов в плодах

инокулированных и контрольных растений приведено в Таблице 2; IC50  $\alpha$ -глюкозидазы и % ингибирования ACE и COX2 приведены в Таблице 3.

Таблица 2.

	Фенолы (мг эквивалента галловой кислоты /100 г свежего веса)		Флавонолы (мг (+)-эквивалентов катехина(195) /100 г свежего веса)		Антоцианы (мг эквивалентов цианидин-3-гликозида /100 г свежего веса)	
	Зима	Весна	Зима	Весна	Зима	Весна
Контроль	154,17± 7,7	389,47± 10,0	6,06± 0,24	87,46± 1,18	9,39± 1,27	23,52± 1,5
QV15	248,45± 6,4	379,44± 7,45	11,28± 0,92	77,67± 1,18	4,62± 0,19	21,19± 1,76

Таблица 3.

	$\alpha$ глюкозидаза (IC50, мг сухого экстракта/мл)		% ингибирования ACE [10 мг сухого экстракта/мл]		% ингибирования COX2 [10 мг сухого экстракта/мл]	
	Зима	Весна	Зима	Весна	Зима	Весна
Контроль	3,80± 0,16	4,66± 0,05	92,15± 0,04	91,180,02	29,59± 0,87	29,02± 0,25
QV15	3,32± 0,04	3,36± 0.22	91,88± 0,01	92,09± 0,07	32,24± 0,88	32,40± 0,49

Экстракт малины готовили из свежей малины сорта «Аделита». Для экстрактов, используемых для измерения влияния на альфа-глюкозидазу, ACE и COX2, ежевику сначала лиофилизировали, затем экстрагировали 80 % метанолом, центрифугировали и упаривали в вакууме органическую фракцию. Охарактеризован экстракт с 20 % воды; тогда как для экстрактов, используемых для остальных измерений, была проведена экстракция 80 % метанолом. Таким образом, измерения, полученные для альфа-глюкозидазы, ACE и COX-2, будут представлены в сухом весе, в то время как для остальных – в свежем весе.

Для характеристики экстракта были сделаны следующие определения:

Общее содержание фенолов в экстракте определяли колориметрическим методом Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. Am J Enol Vitic 10 16,144-158, в основе которого лежит окисление в основной среде гидроксильных групп фенолов реагентом Фолина-Чокалтеу. Результаты выражены в мг галловой кислоты/г экстракта. Таким образом, экстракты, полученные в соответствии с описанными ниже способами, имеют минимальное общее содержание фенола, составляющее 20 мг/г.

Общее содержание флавонола в экстракте определяли колориметрическим методом хлорида алюминия от Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64: 555-559. Doi: 20 10.1016 / S0308-8146 (98) 00102-2 с изменениями. Оно выражается в эквиваленте мг катехина на грамм свежего экстракта.

Общее содержание антоцианина определяли методом дифференциального pH, описанным Giusti and Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001). Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. В: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed) Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York, pp F121-F129. doi: 10.1002 / 0471142913.faf0102s00, который оценивает различную абсорбцию антоцианов при разных значениях pH. Результаты выражены в мг 30 цианидин-3-гликозида на грамм свежего экстракта.

Четвёртый пример. Эксперимент по выявлению клубники (*Fragaria vesca var Fortuna*) путем инокуляции после пересадки каждые две недели на уровне корней в течение всего цикла растений (с января по май 2016 года). Фотосинтез определяли по флуоресценции (Fo, Fv/Fm, фPSII, у NPQ), в середине производственного цикла (март 2016 года) и в конце (май 2016 года); биоактивные соединения (фенолы, флавонолы и антоцианы) и пищевую ценность (pH, °Brix и % лимонной кислоты) в плодах определяли в оба периода и, наконец, были проведены измерения с метанольными экстрактами плодов по поводу ингибирования ферментов, связанных с регуляцией глюкозы (альфа-амилаза и альфа-глюкозидаза), гипертензии (ACE) и воспаления (COX2), ферментов, связанных с метаболическим синдромом. Наблюдалось: i) на уровне фотосинтеза уменьшение Fo и NPQ, поэтому следует понимать, что растение испытывает меньшую нагрузку, чем контроль, и теряет меньше энергии от фотосинтеза в виде тепла, поэтому оно будет применяться для образования

первичных или вторичных метаболитов ii) увеличение антоцианинов, iii) увеличение °Brix, iv) уменьшение количества гнилых плодов и увеличение количества плодов высшего качества, v) увеличение свойств экстрактов фруктов по поводу альфа-глюкозидазы, АСЕ и СОХ2. Содержание антоцианов, фенолов и флавонолов в плодах инокулированных и контрольных растений приведено в Таблице 4; IC50 α-глюкозидазы и % ингибирования АСЕ и СОХ2 приведены в Таблице 5.

Таблица 4.

	Фенолы (мг эквивалента галловой кислоты /100 г свежего веса)		Флавонолы (мг (+)-эквивалентов катехина(195) /100 г свежего веса)		Антоцианы (мг эквивалентов цианидин-3-гликозида /100 г свежего веса)	
	Зима	Весна	Зима	Весна	Зима	Весна
Контроль	315.79± 6.86	188.24± 2.74	80.15± 0.37	38.40± 0.49	17.24± 1.62	21.19± 5.61
QV15	315.79± 22.41	202.50± 2.75	59.38± 1.35	29.30± 0.55	39.11± 0.19	20.28± 2.6

Таблица 5.

	α глюкозидаза (IC50, мг сухого экстракта/мл)		% ингибирования АСЕ [10 мг сухого экстракта/мл]		% ингибирования СОХ2 [10 мг сухого экстракта/мл]	
	Зима	Весна	Зима	Весна	Зима	Весна
Контроль	11,56± 1,05	8,27± 0,43	95,2± 0,06	99,06± 0,02	35,39± 0,21	33,76± 0,32
QV15	9,99± 0,1	10,04± 0,56	92,41± 0,01	91,98± 0,14	36,61± 1,15	34,12± 0,55

Экстракт клубники готовили из свежей клубники сорта «Фортуна». Для экстрактов, используемых для измерения влияния на альфа-глюкозидазу, АСЕ и СОХ2, ежевику сначала лиофилизировали, затем экстрагировали 80 % метанолом, центрифугировали и упаривали в вакууме органическую фракцию. Охарактеризован экстракт с 20 % воды; тогда как для экстрактов, использованных для остальных измерений, была проведена экстракция 80 % метанолом. Таким образом, измерения, полученные для альфа-глюкозидазы, АСЕ и СОХ-2, будут представлены в сухом весе, в то время как для остальных – в свежем весе.

Пятый пример. Эксперимент по выявлению клубники (*Fragaria vesca var Fortuna*) путем инокуляции после пересадки каждые две недели на уровне корней в течение всего цикла растений (с октября по март 2017 года). Фотосинтез определяли по флуоресценции (Fo, Fv/Fm, фPSII и NPQ) в середине производственного цикла (март 2017 г.) и в конце цикла (март 2017 г.), были определены биоактивные соединения (фенолы, флавонолы и антоцианины) и пищевые ценности (рН, °Brix и % лимонной кислоты) и размер плода. Наблюдали: i) увеличение количества более крупных плодов после инокуляции, ii) увеличение количества антоцианов, iii) увеличение количества флавонолов, iv) уменьшение % лимонной кислоты.

Экстракт клубники готовили из свежей клубники сорта «Фортуна». Проводили экстракцию 80 % метанолом.

## ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ.

Учитывая вышеупомянутые свойства *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 в качестве вторичного стимулятора метаболизма, этот бактериальный штамм имеет специфическое применение в агропищевой, химической и фармацевтической промышленности, и его можно применять как часть любого препарата (индивидуально или в сочетании с другими микроорганизмами) и приводить его в контакт (с штаммом или любой его частью) с семенами, корневой или воздушной системой растений любыми доступными способами, у любых видов растений или в любой форме культуры *in vitro*, чтобы увеличить концентрацию вторичных метаболитов фенольной природы с фармакологической и/или диетической целью; в малине и клубнике, чтобы улучшить цвет в межсезонье, особенно за счет увеличения антоцианов; и для получения усиленных экстрактов благодаря их способности ингибировать ферменты альфа-глюкозидазы, ACE и COX2.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), микроорганизм из группы грамм-положительных бактерий рода *Bacillus*, отличающийся своей способностью стимулировать вторичный метаболизм фенольных соединений у видов растений, а именно флавоноидов, антоцианов, катехинов и способностью к увеличению °Brix.

2. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371) по пункту 1, отличающийся своей способностью увеличивать содержание антоцианов в плодах клубники и малины.

3. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), микроорганизм из группы грамм-положительных бактерий рода *Bacillus*, характеризующийся своей способностью усиливать свойства экстрактов плодов малины и клубники в качестве ингибиторов для ферментов, связанных с метаболическим синдромом: альфа-глюкозидазы, регуляторов глюкозы в крови, АСЕ, ангиотензинпревращающий фермент, при гипертонии и СОХ2, при воспалении.

4. Применение *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), или любой молекулы, полученной из него, по любому из пунктов 1 - 3, для применения к любому типу культуры сельскохозяйственного, фармакологического или пищевого назначения, в сельском или лесном хозяйстве, для увеличения количества биологически активных веществ и/или усиления экстрактов листьев и/или плодов для их воздействия на альфа-глюкозидазу, АСЕ и СОХ2.

5. Применение QV15 (СЕСТ 9371), или любой молекулы, полученной из него, по любому из пунктов 1 - 4, для применения к любым видам растений, принадлежащим к семейству *Rubus sp.*

6. Применение *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), или любой молекулы, полученной из него, по любому из пунктов 4 или 5, для применения к любым видам растений с красными ягодами или диким фруктам (например, клубника, малина, ежевика, голубика или черника), или винограду с целью улучшения органолептических свойств и окраски фруктов, особенно благодаря антоцианам.

7. Применение *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), или любой молекулы, полученной из него, по любому из пунктов 1 - 6, либо как отдельного штамма, либо в сочетании с другими организмами, являющимися частью любого препарата, индивидуально

или в сочетании с другим организмом, и любыми доступными способами, с помощью которых бактерии контактируют с семенами, корневой или воздушной системой растений.

8. Применение *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (СЕСТ 9371), или любой молекулы, полученной из него, по любому из пунктов 1–6, либо как отдельного штамма, либо в сочетании с другими организмами, либо являющегося частью любого препарата, индивидуально или в комбинации с другим организмом, и любыми доступными способами, в которых бактерии связываются с растительными клетками в любом состоянии дифференцировки в культуре *in vitro*.