

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041668**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.21

(21) Номер заявки
202100271

(22) Дата подачи заявки
2021.11.24

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
A61K 35/745 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) **КОНСОРЦИУМ БИФИДОБАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИФИДОСОДЕРЖАЩИХ ПРОДУКТОВ, И ШТАММЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ КОНСОРЦИУМА**

(31) **2021100360**

(32) **2021.01.12**

(33) **RU**

(43) **2022.07.29**

(56) **RU-C1-2261909**
RU-C1-2491331
RU-C2-2264450
WO-A1-9844090

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ
ОБЪЕДИНЕНИЕ
"БИФИЛАЙФ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Беспалов Владимир Владимирович,
Казакова Ирина Валерьевна,
Меркулова Людмила Владимировна,
Рогов Алексей Александрович,
Чешева Вера Васильевна (RU)**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, пищевой промышленности, фармакологии, косметологии и может быть использовано для получения бифидосодержащей продукции. Для получения консорциума использованы селекционные штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, *Bifidobacterium longum* В 379М-БЛ, *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ, характерной особенностью которых является способность активно накапливать микробную биомассу на различных питательных средах до высокой концентрации, высокая антибиотическая устойчивость с выраженной антиоксидантной активностью. Супероксиддисмутазная активность консорциума не ниже 37 ед/мг белка микробной массы. Проявляемая специфическая активность консорциума и штаммов, входящих в состав консорциума, способность к утилизации широкого спектра аминокислот, антибиотикоустойчивость, устойчивость к повреждающим факторам агрессивных сред желудочно-кишечного тракта, высокая колонизирующая способность позволили повысить его эффективность для профилактических и лечебных целей.

B1**041668****041668****B1**

Изобретение относится к биотехнологии, пищевой промышленности, фармакологии, косметологии и может быть использовано для получения бифидосодержащих продуктов.

Бифидобактерии являются важнейшими симбионтами желудочно-кишечного тракта человека. У детей к 3-месячному возрасту их доля в микробиоме составляет более 90%, что свидетельствует о ведущей роли этой группы бактерий в становлении и развитии систем гомеостаза человека с раннего возраста. Они обладают морфокинетическим действием, образуют ферменты, участвующие в метаболизме белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот, продуцируют биологически активные соединения, в частности витамины PP, B1, B6, B9, B12. Бифидобактерии выполняют иммуногенную и антимутагенную функции, а также участвуют в детоксикации экзо- и эндогенных токсических агентов, что становится особенно актуальным в современных условиях массированного антропогенного воздействия на биосферу, при котором страдает не только природа, но и сам человек.

Многоплановое позитивное воздействие на организм человека позволяет рассматривать бифидобактерии как эффективную основу для конструирования бифидосодержащей продукции различного назначения на основе перспективных штаммов бифидобактерий.

Кроме того, представителям рода *Bifidobacterium* присвоен статус безопасности GRAS (generally recognized as safe), что подтверждает возможность применения штаммов и метаболитов (продуцентов) штаммов бифидобактерий в производстве безопасных продуктов питания, медицинских препаратов, БАД, косметических и гигиенических средств.

В кишечнике человека в биоценозе преобладают виды *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis* (*Bifidobacterium longum* spp. *infantis*) и *Bifidobacterium breve*. Именно эти пять видов бифидобактерий являются доминантными и в различных сочетаниях создают условия формирования состава и нормального состояния микробиоты здорового человека. (Козлова Э.П., Курносова Н.А., Феклисова Л.В. Теоретические и медико-биологические аспекты использования различных видов бифидобактерий в составе средств профилактики и лечения дисбактериоза кишечника. Сборник трудов. Минздрав РСФСР. М.: 1986 г., стр. 67).

Известны консорциумы пробиотических штаммов различных комбинаций, используемые для приготовления пробиотиков, продуктов лечебного питания, кисломолочных продуктов, биологически активных добавок и бифидосодержащих пищевых продуктов зарубежных и отечественных фирм-разработчиков (RU 2109054 C1, RU 2196173 C1, RU 2196174 C1, RU 2264452 C1, RU 2264450 C1, RU 2261909 C1, RU 2491334 C1, RU 2491333 C, RU 2491332 C1, WO 2014021733, US 7807440 B2, EA 017595 B1).

В настоящее время в лекарственных препаратах, БАД и пробиотических продуктах, выпускаемых в России и за рубежом, используют ограниченный перечень штаммов бифидобактерий.

Было выявлено, что бифидофлора обладает определенной структурой, в соответствии с которой только консорциум бифидобактерий оказывает доминантное влияние на формирование микробиоты, характерной для здорового кишечника (доказано в 88% исследованных случаев), в то время как наличие одного или двух штаммов всегда приводит к дисбиозу (доказано в 42% случаев дисбиоза 1-2 типа и в 86% дисбиоза 3 типа) (Иванова Е.В. Роль бифидофлоры в ассоциативном симбиозе кишечной микробиоты человека. Автореферат дис. докт. мед. наук. Челябинск, 2009, стр. 13).

Из них наиболее широко используемыми являются *Bifidobacterium longum* spp. *longum* штаммы ATCC 15707, RO23, BB536 (Morinaga Milk Industry), SBT-2928, Я-3, B379M, ДБА-13; *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* штамм RO3, 35624 (Procter&Gamble); *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* штаммы 73-15 и 79-43; *Bifidobacterium bifidum* штаммы 1 и 791, 791 БАГ, ЛБА-3, RO71, 8-3; *Bifidobacterium breve* штамм 79-88, 79-119, RO70; *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* штамм DN-173010 (Danone/Dannon); *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen), HN019 (DR10) (Danisco); *Bifidobacterium adolescentis* штамм Г7513, ГО-13, MC-42.

Bifidobacterium animalis подвид *lactis* в различных вариациях названия, выделенный из рубца животного, имеет наименьший размер генома. Это связано с тем, что он обитает в среде с постоянным и простым составом питательного субстрата, в условиях, не требующих постоянной адаптации микробной клетки. Подтверждением этого является наличие только двух полных копий рПНК оперонов, тогда как иные виды имеют до четырех-пяти рПНК оперонов. Пониженные адаптационные свойства штаммов *B. animalis* подвид *lactis* не приводят к формированию устойчивого эубиоза (Бухарин О.В., Перумова Н.Б., Иванова Е.В. Биофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2014, стр. 11).

Традиционно в нашей стране при создании пробиотиков для человека используются штаммы, выделенные от здоровых доноров.

Известные полиштаммовые препараты зачастую представляют собой механический набор пробиотических культур без учета их симбиотичности, способности штаммов, вводимых в состав препаратов, развиваться совместно, не подавляя друг друга. Поэтому производители вынуждены культивировать их раздельно и смешивают их непосредственно перед лиофилизацией. Это приводит к недостаточной колонизирующей активности и жизнеспособности пробиотических штаммов и слабой устойчивости к повреждающим факторам агрессивных сред гастроинтестинального тракта.

Наиболее близким аналогом (прототипом) заявленного консорциума по видовому составу является консорциум пяти видов селекционных штаммов бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791-МБ, *Bifidobacterium longum* В 379М-МБ, *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-МБ, *Bifidobacterium infantis* 73-15-МБ, *Bifidobacterium breve* 79-119-МБ, используемый для приготовления кисломолочных, неферментированных продуктов, биологически активных добавок, бифидосодержащих препаратов, косметических и гигиенических средств (RU 2261909 С1). Штаммы, входящие в состав консорциума, имеют близкие культуральные и биологические свойства, при совместном культивировании консорциум активно размножается на питательных средах с накоплением производственной биомассы в короткие сроки культивирования, обладает специфической активностью. Готовый продукт содержит в 1 мл 10^9 живых клеток бифидобактерий.

Отдельные штаммы консорциума, входящие в его состав, получены из аналогичных коллекционных штаммов путем последовательных 50 циклов лиофилизированной сушки и восстановления.

Недостатком данного консорциума является сложность получения селекционных штаммов, предполагающего проведение 50 циклов последовательной лиофилизированной сушки и восстановления на тиогликолевой среде и обезжиренном молоке, при этом максимальный титр бифидобактерий составляет только 10^9 живых клеток бактерий в 1 мл готового продукта.

Технической проблемой, решаемой в результате создания настоящего изобретения, является разработка консорциума, включающего селекционные штаммы, подобранные по составу не только с учетом биосовместимости, но и придающие консорциуму устойчивость к широкому спектру антибиотиков, повреждающим факторам, обеспечивающим процесс пищеварения в желудочно-кишечном тракте, выраженную антагонистическую активность с наличием высокого титра бифидобактерий 10^{11} КОЕ в 1 г сухой биомассы и получение на его основе бифидосодержащих продуктов с высокими лечебно-профилактическими свойствами, а также упрощение получения консорциума.

Технический результат заключается в том, что предлагаемый консорциум бифидобактерий, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, и штаммы, входящие в его состав, способны активно накапливать микробную биомассу на различных питательных средах до высокой концентрации, обладают высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, являющимся причиной пищевых отравлений, а кроме того, обладают высокой супероксиддисмутазной активностью с выраженной антиоксидантной активностью, при этом супероксиддисмутазная активность составляет не ниже 37 ед/мг белка микробной массы.

Входящие в состав консорциума штаммы могут быть легко идентифицированы с учетом предлагаемых нуклеотидных последовательностей фрагментов их ДНК.

Сущность предлагаемого технического решения заключается в следующем.

Предложен консорциум бифидобактерий, содержащий штамм *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Федерального государственного унитарного предприятия ГосНИИгенетика Минобрнауки (ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика") под регистрационным № Ас-2035, штамм *Bifidobacterium longum* В379М-БЛ, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2037, штамм *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2038, штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2039, штамм *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2036, используемый для приготовления ферментированных, неферментированных пищевых продуктов, биологически активных добавок, бифидосодержащих препаратов, косметических и гигиенических средств, медицинских препаратов.

Предложены следующие оригинальные пробиотические штаммы бифидобактерий, используемые для получения указанного консорциума.

Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, используемый для получения консорциума, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2035, и нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ SEQ ID NO: 1.

Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium longum* В379М-БЛ, используемый для получения консорциума, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2037, и нуклеотидная последовательность фрагмента генома этого штамма SEQ ID NO: 2.

Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, используемый для получения консорциума, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2038, и нуклеотидная последовательность фрагмента генома этого штамма SEQ ID NO: 3.

Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, используемый для получения консорциума, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2039, и нуклеотидная последовательность фрагмента генома этого штамма SEQ ID NO: 4.

Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ, используемый для получения консорциума, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2036, и нуклеотидная последовательность фрагмента генома данного штамма SEQ ID NO: 5.

Для получения предлагаемого консорциума первоначально осуществляют селекцию известных

производственных штаммов пяти видов бифидобактерий без использования методов генетической модификации в результате 30 циклов последовательной лиофилизированной сушки и восстановления на среде "Бифилайф М", а затем посредством совместного культивирования штаммов получают консорциум.

Использованная методика отбора селекционных штаммов учитывала изучение их антибиотикорезистентности, культуральных, антагонистических, морфологических, физиолого-биохимических свойств, молекулярно-генетической идентификации и биосовместимости при совместном культивировании штаммов с учетом кинетики роста каждого из них. Это позволило создать консорциум, способный осуществлять коррекцию микробиологических нарушений более эффективно и безопасно.

Селекция штаммов и их характеристики.

1. Для получения штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ проводилась селекция штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-МБ, который депонирован 15.07.04 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-1688. Организация, осуществившая депонирование, находится по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1. Исходный штамм *Bifidobacterium bifidum* 791-МБ защищен патентом РФ № 2261908. Селекция проводилась без использования методов генетической модификации посредством многократных циклов лиофилизированной сушки и восстановления на питательной среде "Бифилайф М" следующего состава, в г/л:

гидролизат казеина неглубокой степени расщепления, ферментативный - 15,0 г,
 дрожжевой экстракт - 5,0 г,
 глюкоза - 5,0 г,
 натрий хлорид - 2,5 г,
 цистеин гидрохлорид - 0,75 г,
 натрий углекислый - 0,8 г,
 агар микробиологический - 0,075 г,
 $MgSO_4$ - 0,011 г,
 K_2HPO_4 - 0,0001 г,
 $FeSO_4 \cdot H_2O$ - 0,00009 г,
 $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,0001 г,
 В1 (тиамина гидрохлорид) - 0,0002 г,
 В6 (пиридоксина гидрохлорид) - 0,0002 г,
 В3 (кальция пантотенат) - 0,001 г,
 Вс (фолиевая кислота) - 0,00004 г,
 РР (никотинамид) - 0,002 г,
 В2 (рибофлавин) - 0,0002 г,
 глицин - 0,0056 г,
 глутаминовая кислота - 0,0024 г,
 аспарагиновая кислота - 0,0003 г,
 ПАБК - 0,1 г,
 лимонная кислота - 0,0001 г.

Первичный посевной материал производственного штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-МБ в объеме 5% от объема среды культивирования вносили в вышеуказанную среду и культивировали при температуре 37-38°C 24 ч. Далее было проведено 30 циклов сушка-восстановление на питательной среде "Бифилайф М".

В результате проведенной селекции получен штамм *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, который депонирован 16.11.2016 в ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика под регистрационным № Ас- 2035.

Культурально-морфологические и биологические признаки штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ - палочковидные переменные клетки с V-образными раздвоениями на одном или двух концах, неподвижные, в мазке образуют скопления, иногда цепочки, грамположительные. Факультативный анаэроб, оптимальная температура культивирования составляет 37-38°C, pH 7,0±0,2.

Сквашивает молоко с образованием к 16-18 ч стабильного сгустка. Газообразующая способность, каталазообразующая способность, разжижение желатины - отсутствуют.

Кислотообразующая активность: к 24 ч - 70°Т, к 72 ч - 90-100°Т (на печеночной среде Блаурокка), на гидролизатно-молочной среде до 100°Т и 180°Т соответственно.

Максимальный титр бифидобактерий в гидролизатно-молочной среде через 24 ч культивирования составляет 1×10^{10} КОЕ/мл; максимальный титр бифидобактерий в стерильном обезжиренном молоке без ростовых факторов через 24 ч культивирования составляет $1-3 \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Штамм растет на используемых в производстве питательных средах с накоплением биомассы не менее lg 9,8-10,2 микробного числа за 16-18 ч культивирования.

У заявляемого штамма наблюдается выраженная антагонистическая активность к патогенным и условно патогенным микроорганизмам: *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*,

Bacillus subtilis. В табл. 1 представлена антагонистическая активность штамма к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность моноштамма бифидобактерий определяли по зоне задержки роста тест-культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 1

Сравнение антагонистических свойств штаммов *B. bifidum* 791-МБ и *B. bifidum* 791-БЛ

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)						
	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. bifidum</i> 791-МБ	10-12	11-12	9-10	10-12	10-11	10-11	11-12
<i>B. bifidum</i> 791-БЛ	15-25	15-18	13-15	18-22	15-17	18-22	16-17

Анализ данных табл. 1 показывает, что заявляемый штамм обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, являющимся причиной пищевых отравлений.

Определение уровня устойчивости штамма к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде - стерильном обезжиренном молоке. В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовую культуру бифидобактерий в количестве 5% от объема среды. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C.

Кроме того, производственно-полезным признаком штамма *B. bifidum* 791-БЛ, отличающим его от штамма *B. bifidum* 791-МБ, является то, что выращенная в стационарных условиях на среде "Бифилайф М" в объеме 300 см³ культура обладает повышенной супероксиддисмутазной активностью. СОД-активность штамма *B. bifidum* 791-БЛ составляет 27,7 ед/мг белка, содержащегося в бактериальной массе.

Выявленная СОД-активность культуры бифидобактерий свидетельствует о том, что штамм обладает выраженным пробиотическим действием, которое может проявляться в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Высокая активность кислотообразования, устойчивость штамма к основным антибиотикам способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника на фоне антибиотикотерапии.

Условия хранения заявляемого штамма.

Свежеприготовленный штамм *B. bifidum* 791-БЛ хранят на питательной среде с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатин, лимоннокислый натрий, высушивают сублимационным способом в ампулах. Штамм хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение года.

Генетическую идентификацию штамма осуществляли с помощью анализа 16S рПНК.

Консервативные праймеры для наработки 16S рДНК:

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

Таблица 2

Гомология секвенированного фрагмента ДНК депонируемого штамма с предполагаемым видом и наиболее близкими видами

DistanceMatrix												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B. bifidum 791-БЛ	1	---	0,912	0,970	0,919	0,970	0,919	0,901	0,970	0,912	0,898	0,966
D86194	2	0,088	---	0,939	0,911	0,939	0,911	0,924	0,939	1	0,906	0,934
B. bifid4	3	0,030	0,061	---	0,944	1	0,944	0,929	1	0,939	0,924	0,996
D89379	4	0,081	0,089	0,056	---	0,944	1	0,929	0,944	0,911	0,940	0,939
B. bifid5	5	0,030	0,061	0,000	0,056	---	0,944	0,929	1	0,939	0,924	0,996
D89378	6	0,081	0,089	0,056	0,000	0,056	---	0,929	0,944	0,911	0,940	0,939
D86190	7	0,099	0,076	0,071	0,071	0,071	0,071	---	0,929	0,924	0,911	0,924
B. bifidu	8	0,030	0,061	0,000	0,056	0,000	0,056	0,071	---	0,939	0,924	0,996
D86195	9	0,088	0,000	0,061	0,089	0,061	0,089	0,076	0,061	---	0,906	0,934
D86184	10	0,102	0,094	0,076	0,060	0,076	0,060	0,089	0,076	0,094	---	0,924
B. bifid3	11	0,034	0,066	0,004	0,061	0,004	0,061	0,076	0,004	0,066	0,076	---

Исследуемый штамм *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ принадлежит к следующей систематической группе: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; *Bifidobacterium*, причем гомология с видом *Bifidobacterium bifidum* составляет 97%. Анализ по RDP II 16S рПНК базе данных показал гомологию с тем же видом бактерий *Bifidobacterium bifidum*.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (фиг. 1).

Таблица 3

Sequence description

B. bifid5	<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCTC 3202
B. bifid4	<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCTC 3202
B. bifid3	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456 (T)
B. bifidu	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 (T)
D89379	<i>Bifidobacterium subtile</i> JCM 7109
D89378	<i>Bifidobacterium subtile</i> DSM 20096
D86190	<i>Bifidobacterium boum</i> JCM 1211
D86195	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> JCM 1205
D86184	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (T)
D86194	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> JCM 5820
B. bifidum 791-БЛ	Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium bifidum</i> 791-БЛ

По результатам проведенного анализа секвенсов варибельных участков 16S рДНК тестируемый штамм *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ можно отнести к виду *Bifidobacterium bifidum* (97%).

Выделение ДНК для ПЦР.

PCR Protocols. A Guide to methods and applications.

Innis M., Gelfand D., Sninsky J. p. 14-15.

Условия ПЦР.

Каталог MBI Fermentas 1998/1999, 146-157.

Pavlicek A. et al. "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of tree robustness". Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999 45(3) 97-9.

В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ SEQ ID NO: 1, идентичная таковой, представленной на машиночитаемом носителе.

Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов; перенесенных генов резистентности; генетических изменений, связанных с использованием геннотехнических методик; штамм не является зоопатогенным и фитопатогенным.

2. Для получения штамма *Bifidobacterium longum* В 379М-БЛ проводилась селекция штамма *Bifidobacterium longum* В 379М-МБ, который депонирован 15.07.04 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под № Ас-1689. Исходный штамм защищен патентом РФ № 2261907. Селекция проводилась без использования методов генетической модификации посредством многократных циклов лиофилизированной сушки и восстановления на указанной ранее питательной среде "Бифилайф М".

Первичный посевной материал производственного штамма *Bifidobacterium longum* В 379М-МБ в объеме 5% от объема среды культивирования вносили в вышеуказанную среду и культивировали при температуре 37-38°C 24 ч. Далее было проведено 30 циклов сушка-восстановление на питательной среде "Бифилайф М".

В результате проведенной селекции получен штамм *Bifidobacterium longum* В 379М-БЛ, который депонирован 16.11.2016 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под регистрационным № Ас-2037.

Культурально-морфологические и биологические признаки - клетки представляют собой грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1-2 концах, склонные к образованию скоплений. В печеночной среде Блаурокка образует колонии в виде комет.

Факультативный анаэроб, оптимальная температура 37-38°C, pH 7,0±0,2.

Сквашивает молоко с образованием к 16-20 ч стабильного сгустка. Газообразующая способность, каталазообразующая способность, разжижение желатины - отсутствуют.

Кислотообразующая активность: при культивировании на стерильном обезжиренном молоке титруемая кислотность достигает к 18 ч 100°Т, к 20 ч - 120°Т, к 24 ч - 145°Т.

Максимальный титр бифидобактерий в молочном сгустке достигает к 18 ч культивирования и составляет 10⁹ КОЕ/мл.

Штамм растет на используемых в производстве питательных средах с накоплением биомассы не менее lg 9-10 микробного числа за 16-18 ч культивирования.

У штамма наблюдается выраженная антагонистическая активность к патогенным и условно патогенным микроорганизмам: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*. В табл. 4 представлена антагонистическая активность к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность моноштамма бифидобактерий определяли по зоне задержки роста тест-культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 4

Сравнение антагонистических свойств штаммов *B. longum* B379M-МБ и *B. longum* B379M-БЛ

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)						Staphylococcus aureus
	Shigella sonnei	Shigella flexneri	Salmonella typhimurium	Escherichia coli	Candida albicans	Proteus vulgaris	
<i>B. longum</i> B379M-МБ	15-17	18-20	15-17	17-19	15-17	18-20	17-19
<i>B. longum</i> B379M-БЛ	26-30	32-34	20-22	26-28	20-22	30-31	25-26

Анализ данных таблицы показывает, что заявляемый штамм обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, являющимися причиной пищевых отравлений.

Определение уровня устойчивости штамма к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде - стерильном обезжиренном молоке. В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовую культуру бифидобактерий в количестве 5%. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C.

Кроме того, производственно-полезным признаком штамма *B. longum* B379M-БЛ, отличающим его от штамма *B. longum* B379M-МБ, является то, что выращенная в стационарных условиях на питательной среде "Бифилайф М" в объеме 300 см³ культура обладает выраженной супероксиддисмутазной активностью. СОД-активность штамма *B. longum* B379M-БЛ составляет 32,0 ед/мг белка, содержащегося в бактериальной массе. Выявленная СОД-активность культуры бифидобактерий свидетельствует о том, что штамм обладает выраженным пробиотическим действием, которое может проявляться в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Высокая активность кислотообразования, устойчивость штамма к основным антибиотикам способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника на фоне антибиотикотерапии.

Условия хранения заявляемого штамма.

Свежеприготовленный штамм *B. longum* B379M-БЛ на питательной среде с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатин, лимоннокислый натрий, высушивают сублимационным способом в ампулах. Штамм хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение года.

Генетическую идентификацию штамма осуществляли с помощью анализа 16S рРНК.

Консервативные праймеры для наработки 16S рДНК:

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

Таблица 5

Гомология секвенированного фрагмента ДНК депонируемого штамма с предполагаемым видом и наиболее близкими видами

Distance Matrix												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B. longumB379M-БЛ	1	---	0,987	0,987	0,990	0,974	0,974	0,939	0,990	0,980	0,956	0,987
B. suis	2	0,013	---	1	0,998	0,982	0,982	0,953	0,998	0,987	0,969	1
B. indicm	3	0,013	0,000	---	0,998	0,982	0,982	0,953	0,998	0,987	0,969	1
B. longum	4	0,010	0,003	0,003	---	0,985	0,985	0,950	1	0,990	0,966	0,998
D89329	5	0,026	0,018	0,018	0,015	---	1	0,945	0,985	0,995	0,967	0,982
D89330	6	0,026	0,018	0,018	0,015	0,000	---	0,945	0,985	0,995	0,967	0,982
D86186	7	0,061	0,047	0,047	0,050	0,055	0,055	---	0,950	0,945	0,966	0,953
B. plonpl	8	0,010	0,003	0,003	0,000	0,015	0,015	0,050	---	0,990	0,966	0,998
D86196	9	0,021	0,013	0,013	0,010	0,005	0,005	0,055	0,010	---	0,972	0,987
D86187	10	0,044	0,031	0,031	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,028	---	0,969
D86184	11	0,013	0,000	0,000	0,003	0,018	0,018	0,047	0,003	0,013	0,031	---

Исследуемый штамм *Bifidobacterium longum* B379M-БЛ принадлежит к следующей систематической группе: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; *Bifidobacterium*. Анализ по RDP II 16S рРНК базе данных показал наилучшую гомологию с видами бактерий *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium subtile*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium pullorum*. По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (фиг. 2).

Таблица 6

Sequence description	
D86184	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (T)
B. longum	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (T)
B. suis	<i>Bifidobacterium suis</i> ATCC 27533 (T)
D86196	<i>Bifidobacterium pullorum</i> JCM 1214
B. plonpl	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> str. PNC-2-9G ATCC 25526 (T)
D86186	<i>Bifidobacterium choerinum</i> ATCC 27686
D86187	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> str. type strain JCM 1200
B. indicm	<i>Bifidobacterium indicum</i> ATCC 25912 (T)
D89330	<i>Bifidobacterium saeculare</i> DSM 6533
D89329	<i>Bifidobacterium subtile</i> JCM 7109
B. longum B379М-БЛ	Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium longum</i> B379М-БЛ

По результатам анализа секвенсов вариабельных участков 16S рДНК штамм *Bifidobacterium longum* B379М-БЛ можно отнести к виду *Bifidobacterium longum* (99%).

Выделение ДНК для ПЦР.

PCR Protocols. A Guide to methods and applications.

Innis M., Gelfand D., Sninsky J. p. 14-15.

Условия ПЦР.

Каталог MBI Fermentas 1998/1999, 146-157.

Pavlicek A. et al. "Fre-Tree-freeeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of tree robustness". Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999, 45(3) 97-9.

В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium longum* B379М-БЛ SEQ ID NO: 2, идентичная таковой, представленной на машиночитаемом носителе.

Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов; перенесенных генов резистентности; генетических изменений, связанных с использованием геннотехнических методик; штамм не является зоопатогенным и фитопатогенным.

3. Для получения штамма *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ проводилась селекция штамма *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-МБ, который депонирован 15.07.04 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под № Ас-1690. Исходный штамм *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-МБ защищен патентом РФ № 2261904. Селекция проводилась без использования методов генетической модификации посредством многократных циклов лиофилизированной сушки и восстановления на указанной ранее питательной среде "Бифилайф М".

Первичный посевной материал производственного штамма *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-МБ в объеме 5% от объема среды культивирования вносили в вышеуказанную среду и культивировали при температуре 37-38°C 24 ч. Далее было проведено 30 циклов сушка-восстановление на питательной среде "Бифилайф М".

В результате проведенной селекции получен штамм *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, который депонирован 16.11.2016 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под регистрационным № Ас-2038.

Культурально-морфологические и биологические признаки - клетки представляют собой грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1-2-х концах, склонные к образованию скоплений. В печеночной среде Блаурокка и кукурузно-лактозной среде образует колонии в виде гвоздик. Факультативный анаэроб, оптимальная температура 37-38°C, pH 7,0±0,2.

Сквашивает стерильное молоко с образованием к 22-24 ч стабильного плотного сгустка. Газообразующая способность, каталазообразующая способность, разжижение желатины - отсутствуют.

Кислотообразующая активность: при культивировании на стерильном обезжиренном молоке титруемая кислотность достигает к 24 ч 70°Т и накапливает микробную массу бифидобактерий в 1 мл lg 9,0-9,4 микробных клеток.

Кислотообразующая активность: к 24 ч - 70°Т, к 72 ч - 90-100°Т (на печеночной среде), на гидролизно-молочной среде - до 100°Т и 180°Т соответственно. Максимальный титр бифидобактерий в гидролизно-молочной среде через 24 ч культивирования составляет 1×10^{10} КОЕ/мл.

Штамм растет на используемых в производстве питательных средах с накоплением биомассы не менее lg 9,8-10,0 микробного числа за 18-20 ч культивирования.

У штамма наблюдается выраженная антагонистическая активность к патогенным и условно патогенным микроорганизмам *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*. В табл. 7 представлена антагонистическая активность к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность моноштамма бифидобактерий определяли по зоне задержки роста тест-культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 7

Сравнение антагонистических свойств штаммов *B. adolescentis* Г 7513-МБ и *B. adolescentis* Г 7513-БЛ

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)				
	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. adolescentis</i> Г 7513-МБ	24,3	25,9	27,7	26,1	28,3
<i>B. adolescentis</i> Г 7513-БЛ	26-30	26-30	26-30	26-30	28-30

Анализ данных таблицы показывает, что заявляемый штамм обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, вызывающим пищевые отравления.

Определение уровня устойчивости штамма к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде - стерильном обезжиренном молоке. В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовую культуру бифидобактерий в количестве 5%. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C.

Кроме того, производственно-полезным признаком штамма *B. adolescentis* Г 7513-БЛ, отличающим его от штамма *B. adolescentis* Г 7513-МБ, является то, что выращенная в стационарных условиях на питательной среде "Бифилайф М" в объеме 300 см³ культура обладает выраженной супероксиддисмутазной активностью. СОД-активность штамма *B. adolescentis* Г 7513-БЛ составляет 25,0 ед/мг белка, содержащегося в бактериальной массе. Выявленная СОД-активность культуры бифидобактерий свидетельствует о том, что штамм обладает выраженным пробиотическим действием, которое может проявляться в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Высокая активность кислотообразования, устойчивость штамма к основным антибиотикам способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника на фоне антибиотикотерапии.

Условия хранения заявляемого штамма.

Свежеприготовленный штамм *B. adolescentis* Г 7513-БЛ хранят на питательной среде с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатозу, лимоннокислый натрий, высушивают сублимационным способом в ампулах. Штамм хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение года.

Генетическую идентификацию штамма осуществляли с помощью анализа 16S рПНК.

Консервативные праймеры для наработки 16S рДНК

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

Таблица 8

Гомология секвенированного фрагмента ДНК депонируемого штамма с предполагаемым видом и наиболее близкими видами

Distance Matrix												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B. adole	1	---	0,936	0,958	0,958	0,967	0,944	0,947	0,944	0,950	0,977	0,960
D86194	2	0,064	---	0,936	0,938	0,927	0,936	0,947	0,931	0,936	0,930	0,938
B. longum	3	0,042	0,064	---	0,955	0,947	0,947	0,941	0,942	0,957	0,955	0,999
D86183	4	0,042	0,062	0,045	---	0,965	0,951	0,951	0,963	0,958	0,972	0,957
D86197	5	0,033	0,073	0,053	0,035	---	0,941	0,941	0,966	0,969	0,983	0,949
D86188	6	0,056	0,064	0,053	0,049	0,059	---	0,952	0,955	0,961	0,948	0,946
D86190	7	0,053	0,053	0,059	0,049	0,059	0,048	---	0,958	0,951	0,944	0,943
D86187	8	0,056	0,069	0,058	0,037	0,034	0,045	0,042	---	0,978	0,949	0,944
D86182	9	0,050	0,064	0,043	0,042	0,031	0,039	0,049	0,022	---	0,952	0,958
B. adole	10	0,023	0,070	0,045	0,028	0,018	0,052	0,056	0,051	0,048	---	0,955
D86184	11	0,040	0,062	0,001	0,043	0,051	0,054	0,057	0,056	0,042	0,045	---

Исследуемый штамм *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ принадлежит к следующей систематической группе: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; Bifidobacterium, причем гомология с видом *Bifidobacterium adolescentis* составляет 97%.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (фиг. 3).

Таблица 9

Sequence description	
D86197	<i>Bifidobacterium ruminantium</i> JCM 8222
B. adoles	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 (T)
D86183	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC 27534
D86184	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (T)
D86190	<i>Bifidobacterium boum</i> JCM 1211
D86187	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> str. type strain JCM 1200
D86182	<i>Bifidobacterium angulatum</i> str. type strain ATCC 27535 (T)
B. longum	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (T)
D86194	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. globosum JCM 5820
D86188	<i>Bifidobacterium indicum</i> JCM 1302
B. adoles Г 7513-БЛ	Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium adolescentis</i> Г 7513-БЛ

По результатам проведенного анализа секвенсов вариабельных участков 16S рДНК тестируемый штамм *Bifidobacterium adolescentis* Г7513-БЛ можно отнести к виду *Bifidobacterium adolescentis* (97%).

Выделение ДНК для ПЦР.

PCR Protocols. A Guide to methods and applications.

Innis M., Gelfand D., Sninsky J. p. 14-15.

Условия ПЦР.

Каталог MBI Fermentas 1998/1999, 146-157.

Pavlicek A. et al. "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of tree robustness". Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999, 45(3) 97-9.

В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ SEQ ID NO: 3, идентичная таковой, представленной на машиночитаемом носителе.

Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов; перенесенных генов резистентности; генетических изменений, связанных с использованием геннотехнических методик; штамм не является зоопатогенным и фитопатогенным.

4. Для получения штамма *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ проводилась селекция штамма *Bifidobacterium infantis* 73-15-МБ, который депонирован 15.07.04 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под № Ас-1692. Исходный штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-МБ защищен патентом РФ № 2261906. Селекция проводилась без использования методов генетической модификации посредством многократных циклов лиофилизированной сушки и восстановления на указанной ранее питательной среде "Бифилайф М".

Первичный посевной материал производственного штамма *Bifidobacterium infantis* 73-15-МБ в объеме 5% от объема среды культивирования вносили в вышеуказанную среду и культивировали при температуре 37-38°C 24 ч. Далее было проведено 30 циклов сушка-восстановление на питательной среде "Бифилайф М".

В результате проведенной селекции получен штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, который депонирован 16.11.2016 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под регистрационным № Ас-2039.

Культурально-морфологические и биологические признаки - клетки представляют собой грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1-2 концах, склонные к образованию скоплений. В печеночной среде Блаурокка штамм образует колонии в виде комет. В жидких питательных средах растет по всей высоте объема, кроме зоны аэриоза. Факультативный анаэроб, оптимальная температура выращивания 37-38°C, pH питательных сред 7,0±0,2.

Сквашивает стерильное молоко к 24-28 ч с образованием плотного сгустка. Газообразующая способность, каталазообразующая способность, разжижение желатины - отсутствуют.

Кислотообразующая активность: при культивировании на стерильном обезжиренном молоке титруемая кислотность достигает к 24 ч 80°Т, и штамм накапливает микробную массу в производстве питательных средах с накоплением биомассы не менее lg 9-10 микробного числа за 18-22 ч культивирования.

Штамм обладает выраженной антагонистической активностью к патогенным и условно патогенным микроорганизмам *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*. В табл. 10 представлена антагонистическая активность к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность моноштамма бифидобактерий определяли по зоне задержки роста тест-культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 10

Сравнительные данные антагонистической активности штаммов *B. infantis* 73-15-МБ и *B. infantis* 73-15-БЛ

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)				
	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. infantis</i> 73-15-МБ	11,6	11,9	17	12,6	16,9
<i>B. infantis</i> 73-15-БЛ	18-20	23-25	17-21	19-25	17-19

Анализ данных таблицы показывает, что заявляемый штамм обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, вызывающим пищевые отравления.

Определение уровня устойчивости штамма к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде - стерильном обезжиренном молоке. В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовую культуру бифидобактерий в количестве 5%. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C.

Кроме того, производственно-полезным признаком штамма *B. infantis* 73-15-БЛ, отличающим его от штамма *B. infantis* 73-15-МБ, является то, что выращенная в стационарных условиях на питательной среде "Бифилайф М" в объеме 300 см³ культура обладает выраженной супероксиддисмутазной активностью. СОД-активность штамма *B. infantis* 73-15-БЛ составляет 29 ед/мг белка, содержащегося в бактериальной массе. Выявленная СОД-активность культуры бифидобактерий свидетельствует о том, что штамм обладает выраженным пробиотическим действием, которое может проявляться в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Высокая активность кислотообразования, устойчивость штамма к основным антибиотикам способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника на фоне антибиотикотерапии.

Условия хранения заявляемого штамма.

Свежеприготовленный штамм *B. infantis* 73-15-БЛ хранят на питательной среде с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатин, лимоннокислый натрий, высушивают сублимационным способом в ампулах. Штамм хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение года.

Генетическую идентификацию штамма осуществляли с помощью анализа 16S рПНК.

Консервативные праймеры для наработки 16S рДНК:

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

Таблица 11

Гомология секвенированного фрагмента ДНК депонируемого штамма с предполагаемым видом и наиболее близкими видами

Distance Matrix												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B. infantis73-15-Б/І	1	---	0,970	0,973	0,958	0,974	0,933	0,974	0,933	0,934	0,933	0,973
B. longu3	2	0,030	---	0,993	0,980	0,992	0,955	0,992	0,949	0,956	0,950	0,996
B. suis	3	0,027	0,007	---	0,981	0,999	0,954	0,999	0,951	0,958	0,955	0,997
B. indicm	4	0,043	0,020	0,019	---	0,980	0,955	0,980	0,970	0,940	0,949	0,984
B. longum	5	0,026	0,008	0,001	0,020	---	0,952	1	0,949	0,956	0,953	0,996
D86183	6	0,067	0,045	0,046	0,045	0,048	---	0,952	0,946	0,955	0,946	0,956
B. plonpl	7	0,026	0,008	0,001	0,020	0,000	0,048	---	0,949	0,956	0,953	0,996
B. breve	8	0,067	0,051	0,049	0,030	0,051	0,054	0,051	---	0,940	0,939	0,953
D86187	9	0,066	0,044	0,043	0,060	0,044	0,045	0,044	0,060	---	0,965	0,958
D86182	10	0,067	0,050	0,045	0,051	0,047	0,054	0,047	0,061	0,035	---	0,955
D86184	11	0,027	0,004	0,003	0,016	0,004	0,044	0,004	0,047	0,043	0,045	---

Исследуемый штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ принадлежит к следующей систематической группе: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; *Bifidobacterium*. Анализ по RDP II 16S рПНК базе данных показал наилучшую гомологию с видами бактерий *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium pseudolongum*.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (фиг. 4).

Таблица 12

Sequence description

D86184	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (T)
B. longum	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (T)
B. suis	<i>Bifidobacterium suis</i> ATCC 27533 (T)
B. plonpl	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> str. PNC-2-9G ATCC 25526 (T)
D86187	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> str. type strain JCM 1200
B. indicm	<i>Bifidobacterium indicum</i> ATCC 25912 (T)
B. breve	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15700
D86183	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC 27534
D86182	<i>Bifidobacterium angulatum</i> str. type strain ATCC 27535 (T)
B. longu3	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15708
B. infantis 73-15-БЛ	Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium infantis</i> 73-15-БЛ

Исследуемый штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ относится к виду *Bifidobacterium infantis*. Вид *Bifidobacterium infantis* в настоящее время относят к виду *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. По результатам проведенного анализа секвенсов переменных участков 16S рДНК тестируемый штамм *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ можно отнести к виду *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (97%).

Выделение ДНК для ПЦР.

PCR Protocols. A Guide to methods and applications.

Innis M., Gelfand D., Sninsky J. p.14-15.

Условия ПЦР.

Каталог MBI Fermentas 1998/1999, 146-157.

Pavlicek A. et al. "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of tree robustness". Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999, 45(3) 97-9.

В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium*

infantis 73-15-БЛ SEQ ID NO: 4, идентичная таковой, представленной на машиночитаемом носителе.

Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов; перенесенных генов резистентности; генетических изменений, связанных с использованием геннотехнических методик; штамм не является зоопатогенным и фитопатогенным.

5. Для получения штамма *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ проводилась селекция штамма *Bifidobacterium breve* 79-119-МБ, который депонирован 15.07.04 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под регистрационным № Ас-1691. Исходный штамм *Bifidobacterium breve* 79-119-МБ защищен патентом РФ № 2261905. Селекция проводилась без использования методов генетической модификации посредством многократных циклов лиофилизированной сушки и восстановления на указанной ранее питательной среде "Бифилайф М".

Первичный посевной материал производственного штамма *Bifidobacterium breve* 79-119-МБ в объеме 5% от объема среды культивирования вносили в вышеуказанную среду и культивировали при 37-38°C 24 ч. Далее было проведено 30 циклов сушка-восстановление на питательной среде "Бифилайф М".

В результате проведенной селекции получен штамм *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ, который депонирован 16.11.2016 в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" Минобрнауки под регистрационным № Ас-2036.

Культурально-морфологические и биологические признаки - клетки представляют собой грамположительные полиморфные палочки с У-образными раздвоениями на одном или двух концах; неподвижные, склонные к образованию скоплений. В печеночной среде Блаурокка образует колонии в виде комет. В жидких питательных средах растет по всей высоте объема, кроме зоны аэробнозона. Факультативный анаэроб, оптимальная температура выращивания 37-38°C, pH 7,0±0,2.

Сквашивает молоко с образованием плотного сгустка к 16-18 ч. Газообразующая способность, каталазообразующая способность, разжижение желатины - отсутствуют.

Кислотообразующая активность: при культивировании на стерильном обезжиренном молоке титруемая кислотность достигает к 18 ч 120°Т, к 24 ч - 140°Т. Штамм максимально накапливает микробную массу бифидобактерий к 18±2 ч культивирования, достигая в 1 мл 10⁹ КОЕ/мл.

Штамм растет на используемых в производстве питательных средах с накоплением биомассы не менее lg 10,2 микробного числа за 16-18 ч культивирования.

Штамм обладает выраженной антагонистической активностью к патогенным и условно патогенным микроорганизмам *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*. В табл. 13 представлена антагонистическая активность к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность моноштамма бифидобактерий определяли по зоне задержки роста тест-культур патогенных и условно патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 13

Сравнительные данные антагонистической активности штаммов *B. breve* 79-119-МБ и *B. breve* 79-119-БЛ

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)				
	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>B. breve</i> 79-119-МБ	16,0-16,7	18,2-18,9	18-18,5	16,9-17	19,2-20
<i>B. breve</i> 79-119- БЛ	26-30	33-35	26-28	21-25	28-30

Анализ данных таблицы показывает, что заявляемый штамм обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к основным тест-культурам, вызывающим пищевые отравления.

Определение уровня устойчивости штамма к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде - стерильном обезжиренном молоке. В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовую культуру бифидобактерий в количестве 5%. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C.

Кроме того, производственно-полезным признаком штамма *B. breve* 79-119-БЛ, отличающим его от штамма *B. breve* 79-119-МБ, является то, что выращенная в стационарных условиях на питательной среде "Бифилайф М" в объеме 300 см³ культура обладает выраженной супероксиддисмутазной активностью. Выявленная СОД-активность штамма *B. breve* 79-119-БЛ свидетельствует о том, что штамм обладает выраженным пробиотическим действием, которое может проявляться в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Высокая активность кислотообразования, устойчивость штамма к основным антибиотикам способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника на фоне антибиотикотерапии. У заявляемого штамма обнаружена выраженная антиоксидантная активность: супероксиддисмутазная активность штамма - 27,0 ед/мг белка микробной массы.

Условия хранения заявляемого штамма.

Свежеприготовленный штамм *B. breve* 79-119-БЛ хранят на питательной среде с добавлением защитной среды, содержащей сахарозу, желатин, лимоннокислый натрий, высушивают сублимационным способом в ампулах. Штамм хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение

года.

Генетическую идентификацию штамма осуществляли с помощью анализа 16S рПНК.

Консервативные праймеры для наработки 16S рДНК:

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

Таблица 14

Гомология секвенированного фрагмента ДНК депонируемого штамма с предполагаемым видом и наиболее близкими видами

Distance Matrix

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B. breve79-119-БЛ	1	---	0,943	0,974	0,936	0,930	0,930	0,977	0,931	0,943	0,944	0,970
B. longum	2	0,057	---	0,960	0,939	0,954	0,953	0,964	0,946	0,944	0,999	0,956
B. breve8	3	0,026	0,040	---	0,954	0,948	0,948	0,996	0,949	0,960	0,962	0,996
D86186	4	0,064	0,061	0,046	---	0,940	0,930	0,957	0,944	0,960	0,941	0,949
D86183	5	0,070	0,046	0,052	0,060	---	0,947	0,951	0,960	0,949	0,956	0,943
D89379	6	0,070	0,047	0,052	0,070	0,053	---	0,951	0,945	0,941	0,954	0,943
B. breve	7	0,023	0,036	0,004	0,043	0,049	0,049	---	0,952	0,964	0,965	0,991
D86187	8	0,069	0,054	0,051	0,056	0,040	0,055	0,048	---	0,959	0,947	0,944
D86190	9	0,057	0,056	0,040	0,040	0,051	0,059	0,036	0,041	---	0,946	0,956
D86184	10	0,056	0,002	0,038	0,059	0,044	0,046	0,035	0,053	0,054	---	0,957
B. breve7	11	0,030	0,044	0,004	0,051	0,057	0,057	0,009	0,056	0,044	0,043	---

Исследуемый штамм *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ принадлежит к следующей систематической группе: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; Bifidobacterium. Анализ по RDP II 16S рПНК базе данных показал гомологию с тем же видом бактерий *Bifidobacterium breve*.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (фиг. 5)

Таблица 15

RDP ID	Sequence description
B. breve	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15700
B. breve8	<i>Bifidobacterium infantis</i> CIP 6469 (T)
D86184	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (T)
B. breve7	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15698
D86187	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> str. type strain JCM 1200
D86183	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC 27534
B. longum	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (T)
D86186	<i>Bifidobacterium choerinum</i> ATCC 27686
D86190	<i>Bifidobacterium boum</i> JCM 1211
D89379	<i>Bifidobacterium subtile</i> JCM 7109
B. breve 79-119-БЛ	Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium breve</i> 79-119-БЛ

По результатам проведенного анализа секвентов переменных участков 16S рДНК тестируемый штамм *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ можно отнести к виду *Bifidobacterium breve* (97%).

Выделение ДНК для ПЦР.

PCR Protocols. A Guide to methods and applications.

Innis M., Gelfand D., Sninsky J. p. 14-15.

Условия ПЦР.

Каталог MBI Fermentas 1998/1999, 146-157.

Pavlicek A. et al. "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of tree robustness". Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999, 45(3) 97-9.

В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ SEQ ID NO: 5, идентичная таковой, представленной на машиночитаемом носителе.

Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов; перенесенных генов резистентности; генетических изменений, связанных с использованием генотехнических методик; штамм не является зоопатогенным и фитопатогенным.

Получение консорциума и его характеристики.

1-й пассаж - каждый штамм лиофилизированных монокультур *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, *Bifidobacterium longum* B379М-БЛ, *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ ресуспендируют на питательной среде "Бифилайф М" до восьмой пробирики с последующим инкубированием при температуре 37-38°C в течение 48 ч.

2-й пассаж - полученные культуры каждого штамма из пробирок 10^{-7} и 10^{-8} (в посевной дозе 5% от объема питательной среды "Бифилайф М") инокулируют в отдельные емкости. Время культивирования определяется в соответствии с длительностью экспоненциальной фазы роста каждого из них.

3-й пассаж - засев инокулятов монокультур в ферментер производится поэтапно в количестве 3-5%

каждого штамма от объема питательной среды. Процесс совместного культивирования длится 10-12 ч, рН готовой биомассы составляет 4,6-5,2. К полученной биомассе добавляют защитные среды (сахарозо-желатиновую, обезжиренное молоко), суспензию замораживают при температуре не выше минус 45°C, лиофилизируют, получают сухой концентрат с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г. Консорциум хорошо хранится при температуре 6-8°C без потери активности в течение одного года.

Созданный консорциум бифидобактерий показал высокую сочетаемость пяти штаммов бифидобактерий между собой. Совместное культивирование смешанной популяции всех пяти штаммов протекает существенно быстрее по сравнению с раздельным культивированием штаммов.

Культурально-морфологические признаки микроорганизмов, входящих в консорциум - клетки штаммов микроорганизмов консорциума, представляют собой грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1-2 концах, склонные к образованию скоплений. Спор не образуют. Морфология колоний неоднородна и зависит от входящих в консорциум штаммов, сохраняя признаки каждого из них в совокупной культуре. В жидких и полужидких питательных средах растут по всей высоте объема, кроме зоны аэробнозона.

Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов, входящих в консорциум.

Факультативные анаэробы. Оптимальная температура выращивания 37-38°C, рН питательных сред 7,0±0,2. Каталазу не образуют, разжижение желатины отсутствует. Ферментативная активность отдельных штаммов и консорциума по данным ANAEROtest-23 представлена в табл. 16. В качестве иллюстрации в таблице представлено, как расширяется спектр ферментативной активности штаммов при совместном культивировании: увеличивается число усвоенных субстратов.

Таблица 16

Ферментативная активность штаммов бифидобактерий при раздельном и совместном культивировании по данным ANAEROtest-23

Активный ингредиент	<i>B. bifidum</i> 791-Б/Л	<i>B. longum</i> B379M-Б/Л	<i>B. breve</i> 79-119-Б/Л	<i>B. infantis</i> 73-15-Б/Л	<i>B. adolescentis</i> Г7513-Б/Л	Консорциум
D-галактоза	+	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+
D-фруктоза	+	+	+	0	+	+
D-лактоза	+	+	+	+	+	+
D-сахароза	0	+	+	0	+	+
D-мальтоза	0	+	+	0	+	+
D-раffinоза	±	+	+	±	+	+
L-арабиноза	±	+	0	±	±	±
D-ксилоза	±	0	±	±	±	±
Салицин	0	0	±	0	+	+
D-целлобиоза	0	±	+	0	+	+
D-манноза	0	0	+	+	0	+
D-манитол	0	0	+	0	0	+
D-сорбитол	0	+	+	0	0	+

Примечание: (+) - ферментирует; (-) - не ферментирует; (±) - вариабельно; 0 - нет данных.

Кислотообразующая активность: к 24 ч 150°Т, к 72 ч - 180°Т (на питательной среде "Бифилайф М"), на гидролизатно-молочной среде - до 140-160°Т и 170-190°Т соответственно.

Консорциум активно размножается на средах разного состава. In vitro на стандартных питательных средах, при температуре Т 37°C консорциум накапливает биомассу до высокой концентрации пробиотических микроорганизмов 10^{11} КОЕ в 1 г биомассы за счет отсутствия взаимного ингибирования отдельных штаммов (фиг. 6).

Максимальный титр бифидобактерий консорциума в стерильном обезжиренном молоке без ростовых факторов к 22 ч составляет 2×10^{10} КОЕ/мл, на кукурузно-лактозной среде к 20 ч составляет 2×10^{10} КОЕ/мл, на питательной среде "Бифилайф М" после лиофилизации получают сухой концентрат с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г.

Бифидобактерии консорциума способны утилизировать свободные аминокислоты в стерильном обезжиренном молоке, такие как валин, метионин, аланин, аргинин, изолейцин, глицин.

Консорциум проявляет антагонистическую активность к патогенным и условно патогенным микроорганизмам *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*. В табл. 17 представлена антагонистическая активность к некоторым из вышеупомянутых микроорганизмов.

Антагонистическую активность консорциума штаммов бифидобактерий определяли методом развешивающихся смешанных популяций при совместном выращивании с патогенными микроорганизмами по зоне задержки роста тест-культур методом перпендикулярных штрихов.

Синергидный эффект консорциума проявляется также в большей антагонистической активности консорциума по сравнению с прототипом.

Таблица 17

Штамм бифидобактерий	Зона задержки роста тест-культур (мм)					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Заявляемый консорциум в составе <i>Bifidobacterium bifidum</i> 791-БЛ, <i>Bifidobacterium longum</i> В 379М-БЛ, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> Г 7513-БЛ, <i>Bifidobacterium infantis</i> 73-15-БЛ, <i>Bifidobacterium breve</i> 79-119-БЛ,	26-30	26-30	28-30	33-35	20-22	30-31
Прототип в составе <i>Bifidobacterium bifidum</i> 791-МБ, <i>Bifidobacterium longum</i> В 379М-МБ, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> Г 7513-МБ, <i>Bifidobacterium infantis</i> 73-15-МБ, <i>Bifidobacterium breve</i> 79-119-МБ,	24-25	22-24	18-20	20-22	19-21	24-26

Анализ данных таблицы показывает, что заявляемый консорциум оказывает наибольшее антагонистическое действие на основные тест-культуры, вызывающие пищевые отравления.

Определение уровней устойчивости штаммов бифидобактерий к антибиотикам проводили по методу серийных разведений в жидкой питательной среде для каждого штамма в отдельности. В качестве питательной среды использовали стерильное обезжиренное молоко.

В питательную среду вводили различные концентрации стерильных растворов антибиотиков и 16-часовые культуры бифидобактерий в количестве 5% от питательной среды. В контрольный образец вносили только биомассу изучаемого штамма бифидобактерий. Устойчивость определяли по изменению титруемой кислотности в образцах после 48 ч инкубирования при температуре 37-38°C. Штамм устойчив к антибиотикам, когда разница между титруемой кислотностью в контрольном и опытном образцах составляет не более 30°Т.

В табл. 18 представлена устойчивость к антибиотикам отдельных штаммов заявляемого консорциума.

Таблица 18

Устойчивость к антибиотикам штаммов бифидобактерий, составляющих заявляемый консорциум

Антибиотики, доза единицы измерения активности	доза	Титруемая кислотность молока после культивирования со штаммом в градусах по Тернеру.				
		<i>B. bifidum</i> 791-БЛ	<i>B. longum</i> В379М-БЛ	<i>B. adolescentis</i> Г7513-БЛ	<i>B. infantis</i> 73-15-БЛ	<i>B. breve</i> 79-119-БЛ
Амикацин сульфат	10	76-81	78-82	53-58	77-82	82-89
Ампициллин	250	78-82	67-74	63-68	67-73	77-82
Бензилпенициллин, ЕД/см³	10000	71-76	78-82	59-63	83-88	101-105
Гентамицин	400	80-83	57-61	57-60,0	72-75	80-85
Доксициклин	10	45-50	47-51	42-46	53-59	57-59
Канамицин сульфат	20	99-102	81-84	62-69	89-92	111-115
Хлорамфеникол	50	37-41	45-52	38-41	30-34	37-40
Линкомицин	25	80-86	67-72	65-70	85-90	100-103
Оксациллин	10	38-42	40-46	40-46	30-35	40-43
Олеандомицин	12,5	57-62	67-71	50-56	55-60	65-71
Офлоксацин	20	47-51	56-62	60-66	46-51	39-45
Рифампицин	15	45-52	47-53	53-60	46-52	47-51
Стрептомицин	10	89-92	57-61	59-64	71-76	105-111
Сульфадимидин	50	70-76	56-61	51-56	76-80	99-103
Тетрациклин	10	71-76	61-66	55-60	83-88	86-91
Цефазолин	20	47-51	52-56	43-47	37-41	46-49
Бензатина бензилпенициллин (ЕД/см³)	24000	46-48	56-60	37-39	31-33	42-46
Эритромицин	25	37-41	41-43	35-39	23-25	37-39
Контроль		101-105	85-93	70-74	90-97	110-115

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что штаммы бифидобактерий устойчивы к наибольшим концентрациям следующих антибиотиков:

B. bifidum 791-БЛ - к амикацину, ампициллину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, линкомицину, тетрациклину, сульфадимидину, стрептомицину;

B. longum В379М-БЛ - к амикацину, ампициллину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, линкомицину, олеандомицину, офлаксамину, стрептомицину, тетрациклину, сульфадимидину, бензатина бензилпенициллину;

B. adolescentis Г7513-БЛ - к амикацину, ампициллину, бензилпенициллину, канамицину, гентамицину, линкомицину, олеандомицину, тетрациклину, офлаксацину, сульфадимидину, стрептомицину, бензатина бензилпенициллину;

B. infantis 73-15-БЛ - к амикацину, ампициллину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, тетрациклину, линкомицину, сульфадимидину, стрептомицину;

B. breve 79-119-БЛ - к амикацину, ампициллину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, линкомицину, тетрациклину, сульфадимидину, стрептомицину.

Аналогичное исследование в отношении заявленного консорциума бифидобактерий показало, что он обладает устойчивостью по крайней мере к 12 антибиотикам амикацину, тетрациклину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, офлаксацину, сульфадимидину, стрептомицину, ампициллину, линкомицину, олеандомицину и бензатина бензилпенициллину.

Способность консорциума пяти штаммов бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, *Bifidobacterium longum* В379М-БЛ, *Bifidobacterium adolescentis* Г7513-БЛ, *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ активно накапливать микробную биомассу на различных питательных средах за 20-22 ч выращивания, высокая антибиотическая и супероксиддисмутазная активность с выраженной антиоксидантной активностью: супероксиддисмутазная активность консорциума не ниже 37 ед/мг белка микробной массы, проявляемая специфическая активность позволили использовать консорциум в приготовлении ферментированных, неферментированных пищевых продуктов, БАД, бифидосодержащих препаратов, косметических и гигиенических средств.

Проведенные исследования показали, что при совместном культивировании консорциума бифидобактерий на питательной среде "Бифилайф М" отмечается более активное развитие биомассы бифидобактерий в консорциуме по сравнению с отдельным культивированием и не происходит взаимного ингибирования культур (табл. 19).

Таблица 19

Сравнительные данные монокультур и консорциума бифидобактерий

Наименование культуры	Культивирование консорциума бифидобактерий	Раздельное культивирование монокультур
	Число КОЕ/г	Число КОЕ/г
<i>B. bifidum</i> 791-БЛ	10 ¹¹	2х10 ¹⁰
<i>B. infantis</i> 73-15-БЛ		3х10 ¹⁰
<i>B. longum</i> В379М-БЛ		1х10 ¹⁰
<i>B. adolescentis</i> Г7513-БЛ		2х10 ⁹
<i>B. breve</i> 79-119-БЛ		3х10 ¹⁰

Консорциум можно культивировать на различных питательных средах со стабильно высокими показателями КОЕ/мл пробиотических микроорганизмов и продуцируемых органических кислот. Результаты культивирования представлены в табл. 20.

Таблица 20

Результаты культивирования консорциума на разных питательных средах

Среда выращивания	Консорциум бифидобактерий
	Число КОЕ/г
Блаурукка	5х10 ¹⁰
Гидролизатно-молочная	3х10 ⁹
Тиогликолевая	7х10 ¹⁰
Среда «Бифилайф М»	2х10 ¹¹

Полученный консорциум и штаммы, входящие в состав консорциума, могут быть использованы в качестве биологически активного начала пробиотической направленности при производстве пищевых продуктов, продуктов функционального питания, продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания, биологически активных добавок (БАД), косметических, гигиенических средств, медицинских и ветеринарных препаратов.

При этом повышается биологическая ценность продуктов функционального питания и препаратов, изготовленных на его основе. Употребление в пищу продуктов, изготовленных с применением заявленного консорциума, способствует колонизации слизистой кишечника, вытеснению патогенной и условно-патогенной микрофлоры, нормализации кислотности, коррекции кишечного дисбиоза и восстановлению нормальной микрофлоры.

Использование заявленного консорциума и штаммов, входящих в состав консорциума, в производстве ферментированных, неферментированных пищевых продуктов, БАД, бифидосодержащих препаратов, косметических и гигиенических средств - кремов, салфеток, лосьонов тампонов, питательных масок, женских прокладок, мыла, косметического молочка обеспечивает пробиотический и бактериологический эффект, способствует восстановлению нормальной микрофлоры кожных и слизистых покровов, а также направлено на расширение арсенала аналогичных средств.

Реализация назначения заявляемого консорциума бифидобактерий представлена на следующих примерах.

Пример 1. Использование предлагаемого консорциума штаммов бифидобактерий в составе закваски для приготовления кисломолочных продуктов.

Получают консорциум следующим образом.

1-й пассаж - каждый штамм лиофилизированных монокультур *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, *Bifidobacterium longum* В 379М-БЛ, *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ ресуспендируют до восьмой пробирки на питательной среде "Бифилайф М" с последующим инкубированием при температуре 37-38°C в течение 48 ч.

2-й пассаж - полученные культуры каждого штамма из пробирок разведения 10^{-7} и 10^{-8} (в посевной дозе 5% от объема питательной среды "Бифилайф М") инокулируют в отдельные емкости. Время культивирования определяется в соответствии с длительностью экспоненциальной фазы роста каждого из них.

3-й пассаж - засев инокулятов монокультур в ферментер производится поэтапно в количестве 3-5% каждого штамма от объема питательной среды. Процесс совместного культивирования длится 10-12 ч. рН готовой биомассы составляет 4,6-5,2.

Биомассу консорциума бифидобактерий, полученную как показано выше, в объеме не более 5% (от объема молока) вносят в стерильное молоко и культивируют до образования сгустка, который разливают в емкости и охлаждают.

Пример 2. Использование консорциума штаммов бифидобактерий в составе БАД.

В биомассу консорциума бифидобактерий, полученную как показано в примере 1, вносят различные бифидогенные факторы, способствующие стабилизации свойств культуры и лучшей приживаемости штамма в организме. Концентрат, разлитый в емкости, можно непосредственно использовать в качестве БАД лечебно-профилактического действия.

Можно получить сухую биологически активную добавку, для этого к биомассе, полученной по примеру 1, добавляют защитные среды (сахарозожелатиновую, обезжиренное молоко), суспензию замораживают при температуре не выше -45°C, лиофилизируют, укупоривают и получают сухой концентрат с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г, который можно использовать в качестве биологически активной добавки, внося ее в пищевое сырье непосредственно перед употреблением.

Пример 3. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для получения бифидосодержащего медицинского препарата.

В биомассу консорциума бифидобактерий, полученную согласно примеру 1, которая представляет собой жидкий концентрат с высоким титром бифидобактерий, добавляют защитные среды (сахарозожелатиновую, обезжиренное молоко). Полученную суспензию замораживают при температуре не выше -45°C, лиофилизируют, укупоривают и получают сухой концентрат с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г, который можно использовать в качестве бифидосодержащего медицинского препарата.

Пример 4. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для получения кваса или сока.

Биомассу консорциума бифидобактерий, полученную согласно примеру 1, в объеме не более 5% от объема нормализованной смеси (квас или сок) вносят в хлебный квас или сок после их пастеризации из расчета, чтобы содержание бифидобактерий в 1 мл кваса или сока составило не менее 10^7 КОЕ/мл. Квас или сок охлаждают и употребляют без последующего брожения.

Пример 5. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для получения косметического средства.

Биомассу консорциума бифидобактерий, полученную согласно примеру 1, разрушают нагреванием в автоклаве или осуществляют мембранную фильтрацию. Полученные биологически активные компоненты охлаждают и смешивают с кремовой основой в соотношении 1:2-1:20 в зависимости от назначения изготавливаемого крема.

Пример 6. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства варено-копченых колбас.

Биомассу консорциума бифидобактерий, полученную согласно примеру 1, в объеме не более 5% от объема фарша вносят в приготовленный колбасный фарш после добавления соли, пряностей и раствора нитрита натрия. После формования колбасные батоны направляют на осадку, которая осуществляется на рамах при температуре 22°C, влажности 90%. Продолжительность осадки 6 ч. Варка и копчение осуществляются по стандартной технологии.

Пример 7. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства сырокопченых колбас.

Консорциум бифидобактерий в сухом виде, полученный по примеру 2, предварительно восстанавливают в кипяченой охлажденной воде при температуре 37°C, либо активизируют на стерильном коровьем обезжиренном молоке при температуре 37°C в течение 8-10 ч до кислотности 60-65°Т. Полученную биомассу консорциума бифидобактерий вносят в приготовленный колбасный фарш, при этом дозировка вносимого восстановленного консорциума составляет 0,1-0,2% от массы фарша, а дозировка активизированного консорциума составляет 2-5% от массы фарша. Затем обогащенное колбасное сырье обрабатывается по традиционной схеме согласно технологии получения сырокопченых колбас.

Пример 8. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства обогащенной сухой детской молочной смеси.

Небольшое количество сухой молочной смеси тщательно перемешивают с сухим концентратом консорциума бифидобактерий, полученным согласно примеру 2, с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г из расчета не менее 100 г концентрата на 1 т сухой молочной смеси. Затем всю оставшуюся партию молочной смеси тщательно перемешивают с обогащенной сухой молочной смесью для достижения содержания бифидобактерий не менее 10^7 КОЕ/г.

Пример 9. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства обогащенного пива.

К 1 т слабоалкогольного пива добавляют 100 г биомассы консорциума, полученного по примеру 2, и тщательно перемешивают. Титр бифидобактерий в готовом пиве составляет не менее 10^7 КОЕ/мл. Вкус, цвет, пенообразование и другие характеристики пива не изменяются.

Пример 10. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства мороженого.

Для получения мороженого в молоко вносят сливки, полученную смесь нагревают до температуры 35°C , вносят сухие ингредиенты: сахар-песок, стабилизатор, нагревают до температуры 85°C , гомогенизируют, охлаждают до температуры 6°C , вносят сухой бактериальный концентрат консорциума бифидобактерий, полученный согласно примеру 2, с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г в количестве 1-5% к массе смеси.

Пример 11. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства кормовой добавки в животноводстве и птицеводстве.

Для приготовления 100 кг биологически активной кормовой добавки сухой бактериальный концентрат консорциума бифидобактерий, полученный согласно примеру 2, с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г добавляют в количестве 0,01-1% к массе основного корма и тщательно перемешивают.

Пример 12. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства зубной пасты.

Сухой бактериальный концентрат консорциума бифидобактерий, полученный согласно примеру 2, с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г, вводят в состав зубной пасты из расчета 0,01 г бактериального концентрата на 100 г пасты.

Пример 13. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства мягкого сычужного сыра.

Нормализованное молоко, подвергают тепловой обработке при температуре $74-76^{\circ}\text{C}$ в течение 1-5 мин и охлаждают до температуры заквашивания $37-38^{\circ}\text{C}$, вносят 40%-ный водный раствор хлористого кальция из расчета 50 мл на 100 кг молока, 1% сухого бактериального концентрата консорциума бифидобактерий, полученного согласно примеру 2, с содержанием бифидобактерий не менее 10^{11} КОЕ/г. Смесь перемешивают и вносят раствор молокосвертывающего фермента из расчета 1,0-1,2 г на 100 кг молока, затем осуществляют свертывание. Последующее получение мягкого сыра осуществляют по стандартной технологии.

Пример 14. Использование консорциума штаммов бифидобактерий для производства рассольного зрелого сыра.

Свертывание молока проводят при температуре $32-34^{\circ}\text{C}$ в течение 30-45 мин, вносят комбинированную закваску в количестве 1,0-2,0%, состоящую из солеустойчивых чистых культур мезофильных молочнокислых стрептококков; консорциума бифидобактерий, полученного по примеру 1; мезофильных молочнокислых палочек. Закваски бифидобактерий, стрептококков и мезофильных молочнокислых палочек готовят отдельно. Стрептококки, бифидобактерии и мезофильные молочнокислые палочки вносят в производственную закваску. Затем к полученной смеси добавляют хлористый кальций и сычужный фермент для получения сгустка. Последующее получение рассольного зрелого сыра осуществляют по стандартной технологии.

В результате заявленного изобретения получен консорциум на основе пяти селекционных штаммов бифидобактерий, более устойчивый к повреждающим факторам агрессивных сред желудочно-кишечного тракта при прохождении бифидобактерий в желудочно-кишечном тракте, что выражается в повышенной колонизирующей активности. Консорциум обладает выраженной антиоксидантной активностью и пробиотическим действием при отсутствии взаимного ингибирования отдельных штаммов. Заявляемый консорциум является высокотехнологичным, накапливает биомассу на питательных средах в короткие сроки культивирования с высокой концентрацией пробиотических микроорганизмов - 10^{11} КОЕ/г.

Используемая методика отбора селекционных штаммов, предполагающая изучение их антибиотикорезистентности, культуральных, антагонистических, морфологических, физиолого-биохимических свойств и молекулярно-генетической идентификации, позволила создать консорциум, способный осуществлять коррекцию микробиологических нарушений более эффективно и безопасно и расширить арсенал пробиотических средств.

Перечень нуклеотидных последовательностей фрагментов генома штаммов, входящих в консорциум, представлен в соответствии со Стандартом ВОИС ST 25. Справки о депонировании штаммов и перечень нуклеотидных последовательностей на машиночитаемом носителе прилагаются.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791-БЛ, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2035 и содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

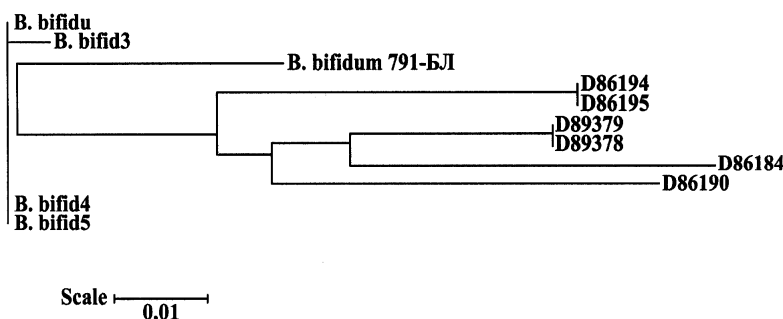
2. Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium longum* В 379М-БЛ, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2037 и содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

3. Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* Г 7513-БЛ, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2038 и содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

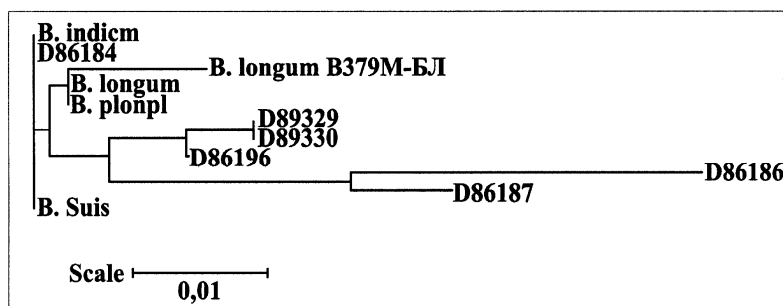
4. Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium infantis* 73-15-БЛ, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2039 и содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Штамм бифидобактерий *Bifidobacterium breve* 79-119-БЛ, используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов, депонированный в ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика" под регистрационным № Ас-2036 и содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5.

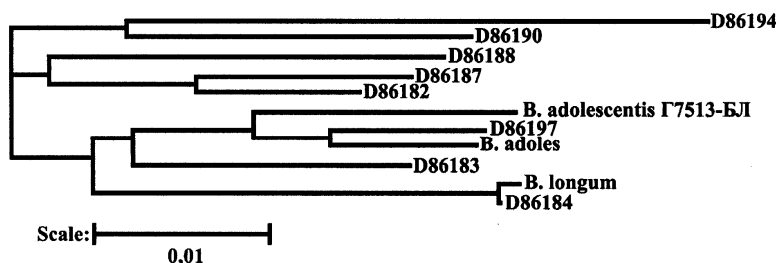
6. Консорциум бифидобактерий, содержащий штаммы по пп.1-5 и используемый для приготовления бифидосодержащих продуктов.



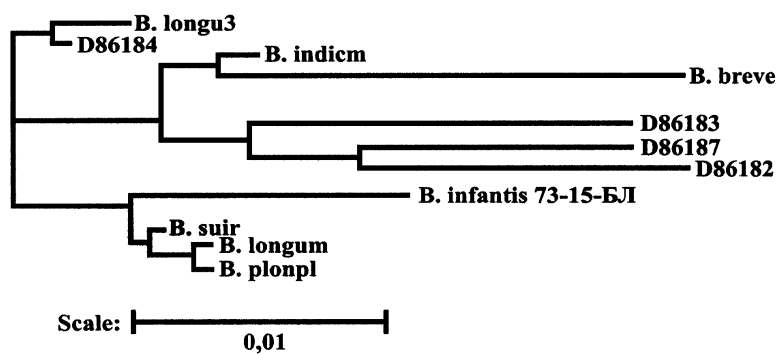
Фиг. 1



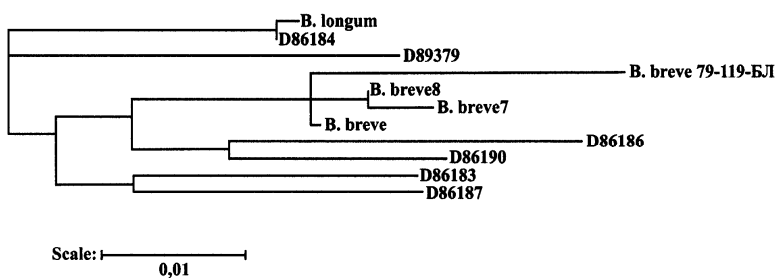
Фиг. 2



Фиг. 3

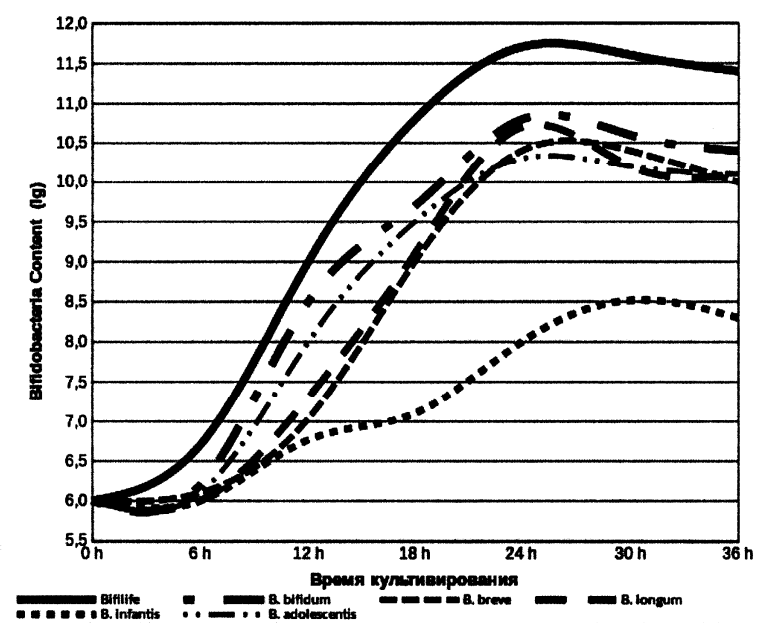


Фиг. 4



Фиг. 5

Содержание бифидобактерий (lg) - Время культивирования (ч)



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2