

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043487**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.26
- (21) Номер заявки
202200070
- (22) Дата подачи заявки
2021.08.12
- (51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) **ШТАММ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM 8, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ПРОБИОТИКА**

- (31) **2020119681**
- (32) **2020.06.15**
- (33) **RU**
- (43) **2022.09.23**
- (86) **PCT/RU2021/050259**
- (87) **WO 2021/256968 2021.12.23**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"АВАН" (RU)**
- (72) Изобретатель:
Терешкова Елена Андрияновна (RU)
- (74) Представитель:
Кареткин Б.А. (RU)
- (56) RU-C1-2184146
RU-C1-2261908
BY-C1-19430
WO-A1-2012104226
CN-A-106834187

-
- (57) Изобретение относится к биотехнологии. Штамм *Bifidobacterium bifidum*, обладающий антагонистической активностью против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИгенетика под коллекционным номером АС-2136. Изобретение обеспечивает расширение ассортимента пробиотиков, способствующих исчезновению клинических проявлений дисбактериоза (дисбиоза) кишечника, болей в желудке, улучшению функции иммунной системы.

B1

043487

043487

B1

Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к биотехнологии, медицинской микробиологии, фармацевтической и пищевой промышленности и представляет собой штамм бифидобактерий вида *Bifidobacterium bifidum*, который может быть использован в лекарственных средствах, функциональных и специализированных пищевых продуктах, в том числе, биологически активных добавках к пище.

Уровень техники.

Бифидобактерий являются основными представителями индигенной микрофлоры человека. Описаны следующие основные функции бифидобактерий в организме человека: бифидобактерий образуют основу микрофлоры, в результате высокой адгезивности к слизистой оболочке кишечника и определяют основные ниши сосуществования для других микроорганизмов, стабилизируют био пленку кишечника; укрепляют эпителиальный барьер кишечника, необходимы для созревания эпителиоцитов; белок клеток бифидобактерий содержит все незаменимые аминокислоты, включая триптофан (Терешкова Е.А. и др., 2020; Иванова Е.В., 2018).

Вид *Bifidobacterium bifidum* согласно современным исследованиям преобладает в кишечном микробиоценозе и необходим для нормального функционирования организма человека (Иванова Е.В., 2018; Turroni F. et al., 2019). Вид *Bifidobacterium bifidum* является доминирующим видом у лиц с нормальным составом микрофлоры и с начальными степенями дисбиоза 1-2 степени. При глубоких нарушениях в микросимбиозе (3 степень дисбиоза) выявляемость вида *Bifidobacterium bifidum* снижается (Иванова Е.В., 2018).

В литературе имеется много данных, свидетельствующих о том, что *Bifidobacterium bifidum* может взаимодействовать с человеком и с микроорганизмами микрофлоры кишечника с помощью различных механизмов, в частности, активировать иммунитет человека, адгезировать на слизистую оболочку кишечника и метаболизировать гликаны, такие как муцин (Turroni F. et al., 2019). Примечательно, что вид *Bifidobacterium bifidum* является единственным представителем среди всех признанных видов бифидобактерий, способным к росту посредством метаболизма муцина (Ruas-Madiedo P. et al., 2008, Turroni F. et al., 2011). Причем метаболизм муцина, осуществляемый *Bifidobacterium bifidum*, может активировать выработку муцина, тем самым увеличивая глубину слоя слизи, обволакивающей слизистую оболочку, и, таким образом, усиливая функцию эпителиального барьера (Rokhsfat S. et al., 2016). Данные свойства позволяют отнести представителей данного вида бифидобактерий к пробиотическим микроорганизмам.

Штамм *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Bifidobacterium bifidum* 791 в составе отечественных препаратов-пробиотиков применяется в широком масштабе во всех возрастных группах с 1972 года по настоящее время (Терешкова Е.А. и др., 2020).

В современной концепции функционального питания существенным весом обладают пребиотики и синбиотики. Согласно общепринятому в научной литературе определению, пребиотики - это пищевые ингредиенты, сочетающие следующие признаки: 1) устойчивые к желудочному соку, гидролизу пищеварительными ферментами человека, и не всасывающиеся в тонком кишечнике, 2) ферментируемые кишечной микрофлорой 3) избирательно стимулируют рост и/или активность одной или ограниченного числа групп бактерий микробиоты кишечника, которые положительно влияют на здоровье хозяина. Смесь синергетически взаимодействующих пробиотиков и пребиотиков, в которой они взаимно усиливают эффективность друг друга, называют синбиотиками (Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995). Также пребиотики часто связывают с так называемым бифидогенным эффектом (Roberfroid M. et al., 2010).

Известен штамм *Bifidobacterium bifidum* 792 (патент RU 2215028), который выделен из содержимого кишечника здорового грудного ребенка, активно размножающийся в питательной среде с накоплением производственной биомассы в короткие сроки культивирования с высокой концентрацией бифидобактерий. Обладает кислотообразующими и ингибирующими свойствами в отношении патогенной и гнилостной микрофлоры. Это позволяет получить кисломолочные, ферментированные и неферментированные пищевые продукты, закваски, гигиенические и косметические средства, биологически активные добавки и бактериальные препараты, обеспечивающие нормализацию микробиоценозов организма человека. Известны штаммы *Bifidobacterium bifidum* 79-32 (патент RU 2314340) и *Bifidobacterium bifidum* В-УН ВКПМ Ас-1875 (патент RU 2453592), выделенные из содержимого кишечника здорового ребенка грудного возраста, которые, кроме указанных выше свойств, заквашивают, либо сквашивают молоко.

Однако, для указанных штаммов не приведена информация об устойчивости к антибактериальным веществам, что осложняет возможность их применения в качестве активного компонента лекарственных препаратов в комплексной терапии ряда заболеваний. Также, для всех указанных штаммов видовая принадлежность не подтверждена современными молекулярно-генетическими методами, что для выделенных из природных источников микроорганизмов в настоящее время является обязательным (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5).

Известен штамм *Bifidobacterium bifidum* 791/БАГ (патент RU 2165454), полученный селекцией штамма *Bifidobacterium bifidum* 791. Штамм более устойчив к повреждающим факторам среды культивирования и агрессивных сред желудочно-кишечного тракта человека, обеспечивает утилизацию более широкого спектра аминокислот, т. е. обладает более высокой жизнеспособностью и колонизирующими свойствами, что обеспечивает получение препаратов и продуктов на его основе с более длительными

сроками хранения и более высокими лечебно-профилактическими свойствами. Однако, для указанного штамма также не приведена информация об устойчивости к антибактериальным веществам, что осложняет возможность его применения как активного компонента лекарственных препаратов в комплексной терапии ряда заболеваний.

Известен штамм *Bifidobacterium bifidum* OV-19 (патент RU 2375444), выделенный из содержимого кишечника здорового грудного ребенка, который, кроме указанных выше свойств, устойчив к широкому спектру антибиотиков, а также сквашивает молоко с образованием ровного сгустка.

Недостатком всех указанных выше штаммов является то, что ни на уровне генотипа, ни на уровне фенотипа не определено отношение к муцину и желчным солям, что, как указывалось выше, является важными особенностями, влияющими на эффективность штамма, как пробиотика.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является штамм *Bifidobacterium* IATA-ES2 WO2010007198A1, выделенный из фекалий здорового ребенка на грудном вскармливании и идентифицированный секвенированием 16S рРНК как представитель вида *Bifidobacterium bifidum*. Штамм предложено применять с целью улучшения защитных функций и снижения риска заболеваний. Показаны следующие механизмы его действия: 1) регуляция гликозилирования кишечника, благоприятствующую таковому у здоровых людей, 2) модуляция взаимодействия между эпителиальными клетками и микробиотой кишечника, способствующую адгезии полезных бифидобактерий, и 3) регуляцию иммунологического ответа. Однако, для указанного штамма не приведена информация об устойчивости к антибактериальным веществам.

Для всех указанных выше штаммов не приведена оценка способности ферментировать селективно стимулирующие рост бифидобактерий углеводные субстраты - пребиотики, что ограничивает возможность их применения в синбиотических функциональных и специализированных продуктах питания. Данная особенность, как указывалось выше, является основным критерием для разработки на основании штамма синбиотических продуктов. Изучение эффективности *in vivo* либо не проводилось, либо проводилось на животных моделях, т.е. полученные результаты не могут в полной мере быть перенесены на человека.

Раскрытие сущности изобретения.

Задачей настоящего изобретения является получение штамма микроорганизмов, с подтвержденной молекулярно-генетическими методами исследования принадлежностью к виду *Bifidobacterium bifidum*, охарактеризованного по показателям необходимым для включения в состав пробиотических лекарственных средств, функциональных и специализированных пищевых продуктов, в том числе, биологически активных добавок к пище.

При решении поставленной задачи достигаются следующие технические результаты: штамм является антагонистом патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, сбраживает молоко с образованием сгустка, отличается активным ростом и образованием органических кислот в средах, содержащих селективно стимулирующие рост бифидобактерий углеводные субстраты - пребиотики, что обуславливает усиление антагонизма против условно-патогенных микроорганизмов. Штамм устойчив к антимикробным веществам канамицину, гентамицину, амикацину. В результате полногеномного исследования показано, что штамм характеризуется наличием генов, кодирующих пептиды, которые отвечают за адгезию к муцину и слизистой кишечника, а также генов, кодирующих ферменты, осуществляющие гидролиз муцина. В результате полногеномного исследования показано, что штамм характеризуется наличием генов, отвечающих за гидролиз желчных солей, что указывает на устойчивость к желчи и участие в регуляции трансформации указанной группы веществ в цикле печень-кишечник-печень, способствуя пищеварению. Применение ферментированных продуктов и бактериальных препаратов на основе заявляемого штамма приводит к исчезновению клинических проявлений дисбактериоза (дисбиоза) кишечника, боли в желудке, улучшению функции иммунной системы, улучшению общего состояния, повышению работоспособности.

Осуществление изобретения

Указанный технический результат достигнут получением нового штамма бактерий *Bifidobacterium bifidum* 8, который выделен из содержимого кишечника здорового человека, идентифицирован по 16S рРНК, и депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИГенетика, коллекционный номер АС-2136.

Заявляемый штамм обладает следующими свойствами.

Полноразмерная последовательность гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК, SEQ ID NO 1 на 100% гомологична типовому штамму вида *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 (ATCC 29521).

Культурально-морфологические свойства

Облигатный анаэроб, оптимальная температура роста 36-38°C.

Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие прямые или слегка изогнутые палочки с утолщением или бифуркацией на одном или обоих концах. Располагаются по одной, чаще по 2 или скоплениями. Характерной особенностью является расположение парных клеток под углом 90° друг к другу на поздних фазах роста.

При культивировании в среде Блаурокка в модификации Г. И. Гончаровой при температуре 37-38°C

в течение 36-48 ч образует колонии белого цвета в виде слаборасширяющихся конусов длиной до 10 мм. При культивировании на поверхности агаризованной (плотной) среды Bifidobacterium Broth фирмы Himedia в анаэробных условиях (bioMerieux GENbox anaer, температура 37-38°C, продолжительность 72 ч) образует плоские сероватые колонии R-формы, диаметром до 5 мм.

Физиолого-биохимические свойства штамма

Штамм желатин не разжижает, каталазу не продуцирует, молоко сквашивает с образованием сгустка. Утилизирует глюкозу без образования газа, с образованием молочной и уксусной кислот, снижая pH среды до 3,8 - 4,2. Утилизирует сахарозу, лактозу, маннозу, целлобиозу. Не утилизирует: арабинозу, ксилузу, инулин (высокой степени очистки), салицин, сорбит.

Штамм устойчив к канамицину, гентамицину, амикацину. Штамм чувствителен к азитромицину, амоксицилину, кларитромицину, доксициклину, тетрациклину, цефтриаксону, ванкомицину, цефепиму, линкомицину, имипенему. В отношении, левофлоксацина, метронидазола, триметоприма, ципрофлоксацина, офлоксацина является промежуточным с учетом концентрации, минимально подавляющей рост (см. примеры).

Штамм является активным антагонистом патогенных микроорганизмов. В присутствии пребиотиков фруктоолигосахаридов (ФОС), либо лактулозы в качестве единственного углевода в питательной среде отличается наибольшей степенью подавления микробных контаминантов пищи и возбудителей инфекционных заболеваний на примере тестовых штаммов *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*.

Установлена безвредность штамма на белых беспородных мышках массой 14-16 г. Суспензию лиофилизированного штамма вводили из расчета примерно 1×10^9 КОЕ. В течение 5 суток все мыши остались живы и не потеряли в весе.

Штамм хранится в лиофилизированном виде в сахарозо-желатиновой среде высушивания не менее 5 лет в герметично закупоренных флаконах без потери указанных свойств.

Пример 1.

Для подтверждения антагонистической активности штамма суспензию лиофилизата, восстановленного в физиологическом растворе, высевали на чашки Петри со средой МРС-5 штрихом по диаметру. Инкубировали культуру в анаэробных условиях (bioMerieux GENbox anaer) при 37°C в течение 48 часов. После этого перпендикулярно зоне роста штамма, но не касаясь ее, высевали тестовые штаммы, используя для каждого отдельную чашку. Через 20 часов определяли зону отсутствия роста (табл. 1). Штамм *Bifidobacterium bifidum* 8 показал высокую антагонистическую активность в отношении тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Таблица 1

Антагонистическая активность штамма <i>Bifidobacterium bifidum</i> 8	
Тест-штамм	Зона отсутствия роста, мм
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	20±2
<i>Escherichia coli</i> 157	27±1
<i>Shigella flexneri</i> 170	21±1
<i>Shigella sonnei</i> 5063	31±1
<i>Proteus vulgaris</i> 177	28±2
<i>Proteus mirabilis</i> Н-237	30±3

Пример 2.

Лиофилизированную культуру штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 ресуспендировали в физиологическом растворе и инокулировали предварительно подвергнутую пастеризации 10% суспензию обратного молока из расчета примерно 2×10^6 КОЕ/мл. Инкубацию проводили при 37°C в течение 48 часов. Результаты представлены в таблице 2. Штамм *Bifidobacterium bifidum* 8 сквашивает молоко с образованием сгустка.

Таблица 2

Показатели сквашивания молока штаммом <i>Bifidobacterium bifidum</i> 8				
Время инкубации	КОЕ/мл	pH	Титруемая кислотность, °Т	Сгусток
12 ч	1×10^7	5,8	46	Отсутствует
24 ч	8×10^7	4,2	92	Со сгустком

Пример 3.

Подтверждение активного роста штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 и образованием органических кислот в средах, содержащих селективно стимулирующие рост бифидобактерий углеводные субстраты - пребиотики, а также их синергетического эффекта против условно-патогенных микроорганизмов проводили по описанному ранее методу (Karetkin В.А. et al., 2019). Представители вида *B. cereus* являются контаминантами пищевых продуктов и возбудителями кишечных инфекций. В качестве тестового исполь-

зовали штамм *B. cereus* ATCC 9634. Ферментацию смешанной культуры бифидобактерий и тест-штамма проводили при температуре 37°C в анаэробных условиях (2% углекислого газа, 98% азота) при постоянном перемешивании в жидкой среде, содержащей в качестве единственного углевода 1% одного из известных коммерческих пребиотиков: фруктоолигосахариды (ФОС, Orafiti® P95, BENEО ORAFIT, Бельгия), изомальтулоза (Palatinose™, BENEО Palatinit GmbH, Германия), лактулоза сухая Лактусан (ООО Фелицата Холдинг, РФ) и D-раффиноза (ООО ДиаМ, РФ). В начальный момент эксперимента и после 9 ч роста оценивали численность обоих микроорганизмов высевом на селективные среды. Определение кислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1220 с рефрактометрическим детектором и колонкой Hi-Plex H (4.6×250 мм). Заявляемый штамм *Bifidobacterium bifidum* 8 характеризуется активным ростом и наибольшим подавлением тест-штамм в синбиотической композиции с ФОС и лактулозой (табл. 3).

Таблица 3
Влияние коммерческих пребиотиков на активность штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 против *B. cereus* ATCC 9634

Субстрат	Кон. численность <i>B. bifidum</i> 8, log(КОЕ/мл)	Кон. pH	Продукция кислот, мМ		<i>B. cereus</i> ATCC 9634	
			Мол.	Укс.	Кон. числ., log(КОЕ/мл)	Изменение числен. X ₉ -X ₀ , КОЕ/мл
ФОС	9,5	5,30	7,8	15,2	5,9	Минус 1,6×10 ⁶
Раффиноза	9,4	5,90	5,0	5,8	6,7	4,1×10 ⁶
Изомальтулоза	9,1	6,01	6,6	4,0	7,0	8,7×10 ⁶
Лактулоза	9,5	4,63	11,4	31,2	4,8	Минус 3,2×10 ⁶

Staphylococcus aureus считается одной из основных причин энтероколита и диареи у пациентов, прошедших курс лечения антибиотиками в госпитальных условиях (Lo T.S., Borchardt S.M., 2009). Исследования проводили по аналогичной методике. Заявляемый штамм *Bifidobacterium bifidum* 8 характеризуется активным ростом и наибольшим подавлением тест-штамм *S. aureus* ATCC 43300 в синбиотической композиции с ФОС и лактулозой (табл. 4).

Таблица 4
Влияние коммерческих пребиотиков на активность штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 против *S. aureus* ATCC 43300

Субстрат	Кон. численность <i>B. bifidum</i> 8, log(КОЕ/мл)	Продукция кислот, мМ		<i>S. aureus</i> ATCC 43300	
		Молочная	Уксусная	Кон. численность, log(КОЕ/мл)	Изменение численности X ₁₀ -X ₀ , КОЕ/мл
ФОС	9,7	6,7	13,7	7,7	3,5×10 ⁷
Раффиноза	9,1	6,7	5,8	8,1	1,3×10 ⁸
Изомальтулоза	9,4	6,9	17,5	8,1	1,1×10 ⁸
Лактулоза	9,8	18,7	45,8	7,6	2,9×10 ⁷

Пример 4.

Определяли чувствительность заявляемого штамма к антимикробным веществам диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в жидкой питательной среде по МУК 4.2.1890-04.

Суточную культуру штамма, полученную инкубированием в среде Блаурокка при температуре 37°C, стандартизовали стерильным забуференным физиологическим раствором до OD₅₆₀=2,1 и высевали по 0,1 мл полученной суспензии на чашки со средой *Bifidobacterium* Broth фирмы Himedia. На поверхность среды помещали диски с антибиотиками (см. табл. 5). Инкубацию проводили в анаэробных условиях (bioMerieux GENbox anaer) при температуре 37°C в течение 3 суток, после чего определяли диаметр зоны угнетения роста (табл. 5).

Таблица 5

Исследования чувствительности штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 к
антимикробным веществам диско-диффузионным методом

Антимикробное вещество, доза на диске	Диаметр зоны задержки роста, мм	Чувствительность
Амоксициллин 20 мкг	36	Ч
Цефтриаксон 30	24	Ч
Цефепим 30 мкг	28	Ч
Имипенем 10 мкг	28	Ч
Доксициклин 30 мкг	26	Ч
Кларитромицин 30 мкг	34	Ч
Линкомицин 15 мкг	30	Ч
Ванкомицин 30 мкг	16	Ч
Ципрофлоксацин 5 мкг	8	П
Офлоксацин 5 мкг	10	П
Амикацин 30 мкг	0	У

Для метода серийных разведений использовали жидкую питательную среду MRS с цистеином и аскорбиновой кислотой и антимикробные вещества (см. табл. 6) для биохимических исследований. Лекарственные препараты на основе данных веществ наиболее часто применяются в современной терапии. Для каждого вещества готовили серию последовательных двукратных разведений в стерильной среде от 512 до 0,125 мкг/мл. Инокулировали 10% суточной культурой штамма, предварительно стандартизованной по $OD_{560}=1,5$. Через 10 ч инкубирования при температуре 37°C в анаэробных условиях (2% углекислого газа, 98% азота) и при постоянном перемешивании измеряли мутность суспензии, кривые зависимости данной величины от концентрации антимикробного вещества носили сигмоидальный характер. Из зависимостей определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) и минимальную концентрацию антимикробного вещества, при которой начинается наблюдаемое подавление роста (табл. 6). Определение данной величины связано со следующими соображениями. Для достижения лечебного действия необходимо попадание в кишечник человека или животного определенного количества живых клеток бифидобактерий, что может быть обеспечено только при минимальном воздействии антибактериальных веществ. Поэтому устойчивость определяли с учетом указанной величины, а не только с учетом МПК, как это принято для патогенных микроорганизмов, когда выживание даже небольшого количества клеток может привести к заболеванию.

Таблица 6

Исследование чувствительности штамма к антимикробным веществам
методом серийных разведений в жидкой питательной среде

Антимикробное вещество	Минимальная концентрация начала наблюдаемого подавления роста, мкг/мл	МПК, мкг/мл	Чувствительность
Амоксицилин	0,125	0,125	Ч
Цефтриаксон	0,125	1	Ч
Тетрациклин	0,125	2	Ч
Доксициклин	0,25	2	Ч
Азитромицин	0,125	0,125	Ч
Кларитромицин	0,125	0,125	Ч
Ципрофлоксацин	2	16	П
Левифлоксацин	0,125	32	П
Метронидазол	0,5	16	П
Нифуроксазид	4	32	П
Триметоприм	4	128	П
Канамицин	64	более 512	У
Гентамицин	16	128	У

Штамм устойчив (У) к канамицину, гентамицину, амикацину. Чувствителен (Ч) к амоксицилину, цефтриаксону, цефепиму, имипенему, тетрациклину, доксициклину, азитромицину, кларитромицину, линкомицину, ванкомицину. В отношении офлоксацина, ципрофлоксацина, левофлоксацина, метронидазола, нифуроксазида, триметоприма является промежуточным (П) с учетом минимальной концентрации начала наблюдаемого подавления роста.

Результаты полногеномного исследования показали отсутствие генов с маркерами устойчивости к тетрациклину tet(W) (SEQ ID NO: 2) и trp-tet(W) (SEQ ID NO: 3), что также подтверждено фенотипически.

Пример 5.

Молекулярно-биологические признаки штамма определяли на основании полногеномного исследования.

Анализ полученного генома показал, что штамм *Bifidobacterium bifidum* 8 не содержит плазмид.

Анализ полученного генома показал наличие генов, кодирующих пептиды клеточной стенки, отвечающие за специфическую адгезию. Коллаген связывающий протеин участвует в адгезии к эпителию. Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 4) с пептидом фимбриального пили *Bifidobacterium bifidum* (NCBI GenBank SEQ ID NO: BBA48285.1) составляет 99%.

Протеин, кодируемый геном OppA, отвечает за связывание с клетками эпителия кишечника Caco-2 (Guglielmetti S. ety al., 2008). Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 5) с олигопептид связывающим протеином OppA *Bifidobacterium bifidum* (NCBI GenBank SEQ ID NO: KLN80891.1) составляет 100%.

Образование трансальдозы значительно увеличивает степень связывания клеток бактерий - представителей кишечной микробиоты с муцином (Gonzalez-Rodriguez I. et al., 2012). Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 6) с трансальдозой *Bifidobacterium bifidum* (NCBI GenBank SEQ ID NO: WP003813255.1) составляет 100%.

Эндо альфа-N-ацетилгалактозаминидаза участвует в гидролитическом разложении муцина (отщеплении от пептидной цепи углеводных остатков). Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 7) с эндо альфа-N-ацетилгалактозаминидазой *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 (NCBI GenBank SEQ ID NO: BAQ97477.1) составляет 99%.

Одним из основных механизмов, обуславливающих устойчивость бактерий кишечника к солям желчи, секретлируемым печенью, является их расщепление ферментами (Ruiz L. et al., 2013). Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 8) с гидролазой солей желчи *Bifidobacterium bifidum* (NCBI GenBank SEQ ID NO: AAR39435.1) составляет 99%.

Фосфопируват гидролаза также участвует в расщеплении желчных солей. Гомологичность обнаруженной структуры (SEQ ID NO: 9) с фосфопируват гидролазой *Bifidobacterium bifidum* (NCBI GenBank SEQ ID NO: WP_003812660.1) составляет 100%.

Пример 6.

Использование штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 в лекарственных средствах.

На основе штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 получали лиофилизированную биомассу бифидобактерий. Из чистой культуры путем проведения 2-3 пассажей получали маточную культуру (инокулят) в среде Блаурокка по одному из известных способов. Инкубирование проводили при 37°C. Далее проводили культивирование с поддержанием pH в интервале 5,5-7,0. Полученную культуру, содержащую не менее 2×10^9 КОЕ/мл, отделяли от среды культивирования с применением центрифугирования, сепарирования, либо других способов, применяемых для суспензий бактериальных клеток. К полученному концентрату добавляли сахарозо-желатиновую среду высушивания, замораживали во флаконах или на поддонах для сушки из пищевой легированной стали до температуры не выше минус 40-45°C и подвергали лиофильному высушиванию. Остаточная влажность составляла не более 5%. Полученную лиофилизированную биомассу, содержащую не менее 5×10^{10} КОЕ/г, используют в качестве активного компонента лекарственных средств, стандартизуя наполнителем из расчета разовой дозы $(5-10) \times 10^8$ КОЕ.

Пример 7.

Использование штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 в функциональных и специализированных пищевых продуктах, в том числе, биологически активных добавках к пище.

Полученную аналогично описанному в примере 6 методу лиофилизированную биомассу применяют в качестве основного ингредиента пробиотических биологически активных добавок к пище в различных товарных формах (порошки, капсулы и т.п.) из расчета 1×10^8 - 1×10^9 КОЕ в разовой дозе. Лиофилизированную биомассу бифидобактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 вносят в жидкие ферментированные продукты для заквашивания и сквашивания, либо для обогащения в ферментированные или не ферментированные продукты из расчета 10^6 - 10^7 КОЕ в 1 г готового продукта. Благодаря этому получаемые продукты могут быть отнесены к функциональным продуктам питания.

Пример 8.

Полученную, как описано в примере 6, суспензию клеток штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 в среде высушивания дозировали в пенициллиновые флаконы из расчета разовой дозы $(5-10) \times 10^8$ КОЕ и лиофилизировали. Применение лиофилизированной биомассы в указанной разовой дозе 4 раза в день внутрь курсами от 8 до 32 дней у добровольцев мужчин и женщин в возрасте 45 лет, 61 год, 66 лет, 72 года, 93 года приводило к исчезновению выраженных болей в желудке, развившихся на фоне обострения хронического гастрита (без приема лекарственных препаратов); исчезновению проявлений дисбактериоза (дисбиоза) кишечника (метеоризм, боли в животе, нерегулярный стул, разжиженный стул, задержка стула); быстрому купированию симптомов ОРВИ (в течение 1-3 дней), особенно при приеме в ранние сроки заболевания; исчезновению лабиального герпеса; улучшению общего состояния, повышению физической, умственной активности, работоспособности, улучшению эмоционального состояния (исчезновение пониженного настроения, раздражительности, эмоциональной лабильности).

Пример 9.

Женщина, 57 лет. Многократные курсы химиотерапии в связи с раком яичников. На этом фоне выраженный дисбактериоз (дисбиоз) кишечника, боли в животе, прием любых продуктов сопровождается метеоризмом, диарейный синдром с водянистым стулом. Употребляла кефир, обогащенный бифидобактериями штамма *Bifidobacterium bifidum* 8 в количестве 10^6 КОЕ в 1 мл в течение 4 дней, первые два дня по 300 мл в день, последующие дни по 200 мл в день. Общий объем кефира 1 литр. Диарея полностью исчезла на второй день приема кефира, на четвертый день стул приобрел оформленную консистенцию, исчезли боли в животе, значительно уменьшился метеоризм, улучшилось общее состояние.

Библиография.

1. Терешкова Е.А., Кареткин Б.А., Дорошенко Е.О., Ланских А.Г. Сорбированные пробиотики. Механизм действия. – М.: ТД ДеЛи, 2020 – 36 с.
2. Иванова Е.В. Роль бифидофлоры в ассоциативном симбиозе кишечной микробиоты человека. Дисс. д.м.н. Оренбург. 2018:295.
3. Turroni F., Duranti S., Milani C., Lugli G.A., van Sinderen D., Ventura M. *Bifidobacterium bifidum*: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. //Microorganisms. 2019, 9; 7(11).
4. Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Fernandez-Garcia M., de los Reyes-Gavilan C.G., Margolles A. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. //Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74, 1936–1940.

5. Turróni F., Milani C., van Sinderen, D., Ventura, M. Genetic strategies for mucin metabolism in *Bifidobacterium bifidum* PRL2010: An example of possible human-microbe co-evolution. *Gut Microbes* 2011, 2, 183–189.
6. Rokhsafat S., Lin A.F., Comelli E.M. Mucin-Microbiota Interaction During Postnatal Maturation of the Intestinal Ecosystem: Clinical Implications. *Dig. Dis. Sci.* 2016, 61, 1473–1486.
7. Gibson G.R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *The Journal of Nutrition*. 1995, Vol. 125, p. 1401–1412
8. Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. // *Br J Nutr.* 2010, Vol. 104, S. 2, S1-S63
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria Editors: Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K.-I., Parte, A. (Eds.) 2012
10. Karetkin B. A., Guseva E. V., Evdokimova S. A. et al. A quantitative model of *Bacillus cereus* ATCC 9634 growth inhibition by bifidobacteria for synbiotic effect evaluation // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 35. P. 89
11. Lo T.S., Borchardt S.M. Antibiotic-associated diarrhea due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009. Vol.63 (4), P. 388-389
12. Guglielmetti S., Tamagnini I., Mora D., Minuzzo M., Scarafoni A., Arioli S., Hellman J., Karp M., Parini C. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(15), 4695–4702
13. González-Rodríguez I., Sánchez B., Ruiz L., Turróni F., Ventura M., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and environmental microbiology*, 2012, 78(11), 3992–3998.
14. Ruiz L., Margolles A., Sánchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. // *Frontiers in microbiology*, 2013, 4, 396

Перечень последовательностей.

<160> 9

<210> 1

<211> 1534

<212> DNA

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 1

ttttttgtgg	agggttcgat	tctggctcag	gatgaacgct	ggcggcgtgc	ttaacacatg	60
caagtcgaac	gggatccatc	aagcttgctt	ggtggtgaga	gtggcgaacg	ggtgagtaat	120
gcgtgaccga	cctgccccat	gctccggaat	agctcctgga	aacgggtggt	aatgccggat	180
gttccacatg	atcgcatgtg	attgtgggaa	agattctatc	ggcgtgggat	ggggtcgcgt	240
cctatcagct	tgttggtgag	gtaacggctc	accaaggctt	cgacgggtag	ccggcctgag	300
agggcgaccg	gccacattgg	gactgagata	cgcccagac	tctacggga	ggcagcagtg	360
gggaatattg	cacaatgggc	gcaagcctga	tcagcgcgac	ccgcgtgagg	gatggaggcc	420
ttcgggtgtg	aaacctctt	tgttgggag	caagccttcg	ggtgagtgtg	cctttcgaat	480
aagcgcgggc	taactacgtg	ccagcagccg	cgtaatafcg	tagggcgcaa	gcgttatccg	540
gatttattgg	gcgtaagggg	ctcgtaggcg	gctcgtcgcg	tccggtgtga	aagtccatcg	600
ctaacgggtg	gatctgcgcc	gggtacgggc	gggctggagt	gcggtagggg	agactggaat	660
tcccggtgta	acggtggaat	gtgtagatat	cgggaagaac	accgatggcg	aaggcaggtc	720
tctgggccgt	cactgacgct	gaggagcgaa	agcgtgggga	gcgaacagga	ttagataccc	780
tggtagtcca	cgccgtaaac	ggtggacgct	ggatgtgggg	cacgttccac	gtgttccgtg	840
tcggagctaa	cgcgftaagc	gtcccgcctg	gggagtacgg	ccgaaggct	aaaactcaaa	900
gaaattgacg	ggggcccgca	caagcggcgg	agcatcgga	ftaattcgat	gcaacgcgaa	960
gaaccttacc	tgggcttgac	atgttcccga	cgacgccaga	gatggcgttt	cccttcgggg	1020
cgggttcaca	ggtggtgcat	ggtcgtcgtc	agctcgtgtc	gtgagatgtt	gggttaagtc	1080
ccgcaacgag	cgcaaccctc	gccccgtgtt	gccagcacgt	tatggtggga	actcacgggg	1140
gaccgccggg	gttaactcgg	aggaagggtg	ggatgacgct	agatcatcat	gccccttacg	1200
tccagggttt	cacgeatgct	acaatggccg	gtacagcggg	atgcgacatg	gcgacatgga	1260
gcggtaccct	gaaaaccggt	ctcagttcgg	atcggagcct	gcaaccggc	tccgtgaagg	1320
cggagtgcct	agtaatcgcg	gatcagcaac	gccgcgggtg	atgcgttccc	gggccttcta	1380
cacaccgccc	gtcaagtcat	gaaagtgggc	agcaccgaa	gccggtggcc	taacccttg	1440
tggtgatggag	ccgtctaagg	tgaggctcgt	gattgggact	aagtcgtaac	aaggtagccc	1500
taccggaagg	tgccgctgga	tcacctcctt	tcta			1534

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tggaattctt gcccatgtag acg 23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

attcagcgac gaactggcac ag 22

<210> 4

<211> 534

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 4

Met Lys Phe Lys Lys Leu Phe Ala Gly Val Ala Ala Ala Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Met Ala Phe Gly Thr Gly Ala Ala Asn Ala Ala Glu Thr
 20 25 30
 Thr Val Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Phe Lys Ala Ser Lys Glu Lys
 35 40 45
 Gln Leu Thr Ser Ala Gln Leu Ser Ala Tyr Lys Ile Ala Asp Tyr Val
 50 55 60
 Asn Tyr Gly Thr Ala Lys Thr Pro Val Tyr Gly Val Lys Thr Ala Ala
 65 70 75 80
 Gly Ala Asn Arg Thr Lys Leu Ala Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Phe
 85 90 95
 Gln Asn Val Pro Ile Asp Gly Thr Thr Asp Leu Met Ala Trp Ala Met
 100 105 110
 Asn Gln Lys Thr Thr Thr Asp Thr Asp Gly Thr Val Thr Gln Val Gln
 115 120 125

Phe Asp Gln Ser Glu Thr Arg Pro Trp Asn Asn Pro Ser Val Thr Arg
 130 135 140
 Lys Phe Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Asn Pro Phe Thr Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Asp Pro Phe Val Leu Asn Lys Ala Thr Gly Asn Asp Thr Asp Gly Trp
 165 170 175
 Thr Ala Thr Asn Lys Thr Ala Leu Thr Ala Gly Val Tyr Leu Phe Leu
 180 185 190
 Asp Gly Asn Ala Ser Thr Asp Thr Leu Thr Gln Ala Val Pro Met Ile
 195 200 205
 Val Ser Thr Gly Ser Val Asp Ala Glu Gly Val Leu Ser Leu Gly Asp
 210 215 220
 Ser Thr Ala Glu Val Asp Met Lys Ser Thr Val Ser Gly Thr Gln Thr
 225 230 235 240
 Lys Ser Thr Thr Ser Lys Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Pro Phe
 245 250 255
 Glu Leu Gly Tyr Thr Ile Pro Asn Pro Val Pro Thr Asp Phe Thr Leu
 260 265 270
 Gln Phe Lys Asp Val Pro Ser Lys Gly Leu Thr Val Asn Phe Ala Ser
 275 280 285
 Leu Thr Val Lys Ala Gly Asp Lys Val Leu Thr Asp Thr Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Val Glu Asn Asn Leu Thr Asp Asn Lys Gly Asp Gly Thr Asn Thr Phe
 305 310 315 320
 Val Val Lys Ile Thr Asp Pro Ala Lys Tyr Ala Gly Lys Gln Ile Thr
 325 330 335
 Ile Thr Tyr Asn Ala Thr Val Asn Asp Glu Ala Glu Thr Val Glu Gly
 340 345 350
 Gln Asp Tyr His Ala Val Thr Asn Lys Leu Val Gly Asn Asp Gly Thr
 355 360 365
 Pro Ile Pro Gly Thr Glu Thr Leu Thr Lys Ile Phe Gly Phe Lys Phe
 370 375 380
 Thr Lys Val Asn Ala Gln Gly Glu Ala Val Glu Gly Ala Lys Phe Thr
 385 390 395 400

Leu Ser Val Ala Lys Asp Gln Asn Gly Val Leu Pro Asn Ser Asp Lys
 4 0 5 4 1 0 4 1 5
 Tyr Pro Leu Glu Val Thr Ser Gly Ala Asn Gly Val Val Lys Phe Asp
 4 2 0 4 2 5 4 3 0
 Gly Leu Lys Ala Gly Ser Tyr Thr Val Thr Glu Thr Ala Val Ala Asp
 4 3 5 4 4 0 4 4 5
 Gly Tyr Gln Asp Phe Lys Ala Ser Phe Thr Val Ala Ile Asp Glu Asn
 4 5 0 4 5 5 4 6 0
 Gly Lys Val Thr Phe Ala Gly Thr Asp Ser Trp Gly Leu Ala Pro Lys
 4 6 5 4 7 0 4 7 5 4 8 0
 Gly Ser Ala Asp Asp Tyr Lys Val Thr Asn Val Lys Ser Val Phe Glu
 4 8 5 4 9 0 4 9 5
 Leu Pro Lys Thr Gly Ala Ala Gly Ile Ala Leu Phe Val Val Ile Ala
 5 0 0 5 0 5 5 1 0
 Ala Leu Leu Gly Gly Ala Ala Ala Thr Val Tyr Ala Lys Ser Arg Arg
 5 1 5 5 2 0 5 2 5
 Thr Ser Arg Ala Leu Arg
 5 3 0

<210> 5

<211> 596

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 5

Met Gln Ser Met Ser Phe Ala Ser Thr Ala Arg Lys Val Thr Ala Phe
 1 5 1 0 1 5
 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Leu Ala Leu Gly Ala Cys Gly Asn Ser
 2 0 2 5 3 0
 Asn Asn Gly Ser Ala Gly Asn Asn Gly Ala Lys Ser Thr Ser Glu Pro
 3 5 4 0 4 5
 Gln Glu Gly Val Pro Thr Asn Tyr Thr Gly Ser Phe Pro Met Pro Asp
 5 0 5 5 6 0
 Pro Gly Lys Ala Tyr Asn Asn Pro Lys Asp Arg Gly Glu Leu Lys Gln
 6 5 7 0 7 5 8 0

Arg Lys Ala Phe Val Gln Gly Val Asp Arg Ser Gln Leu Gln Lys Ile
 355 360 365
 Asp Phe Gln Gly Ile Glu Trp Thr Glu Lys Thr Pro Gly Ser Leu Ile
 370 375 380
 Leu Pro Gln Phe Gln Asp Gly Tyr Glu Asp Asn Met Pro Ala Glu Ser
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ser Thr Ala Asn Ala Thr Lys Thr Leu Glu Asp Ala Gly Tyr
 405 410 415
 Lys Lys Asn Ser Asp Gly Tyr Tyr Glu Lys Gly Gly Lys Val Ala Ala
 420 425 430
 Ile Thr Tyr Thr Thr Phe Ser Asp Ser Ala Ser Thr Lys Ala Lys Ala
 435 440 445
 Thr Ala Ile Gln Lys Met Ala Lys Thr Val Gly Ile Lys Val Ser Ile
 450 455 460
 Asp Ile Lys Ala Ser Asn Thr Phe Ser Asp Thr Val Ser Ser Gly Asn
 465 470 475 480
 Trp Asp Met Ile Gly Leu Gly Trp Ser Ala Ser Asp Pro Phe Gly Tyr
 485 490 495
 Ala Ser Ser Ala Tyr Gln Leu Tyr Gly Ser Lys Ser Glu Ser Asn Phe
 500 505 510
 Ser Phe Thr Gly Thr Asp Glu Ile Asp Lys Glu Leu Glu Ser Ile Pro
 515 520 525
 Gly Ile Lys Asp Ser Thr Lys Ala Ile Ala Gln Phe Asn Lys Ala Glu
 530 535 540
 Lys Glu Ala Gln Lys Leu Tyr Ala Gln Ile Pro Phe Glu Asn Gly Gln
 545 550 555 560
 Ile Thr Val Ala Val Lys Lys Gly Leu Ala Asn Tyr Gly Pro Ala Gly
 565 570 575
 Tyr Ser Ser Gly Ala Arg Val Met Val Thr Val His Pro Glu Asn Leu
 580 585 590
 Gly Trp Glu Lys
 595

<210> 6

<211> 367

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 6

Met Thr Glu Ala Thr Gln Arg Thr Ser Asp Asn Gly Val Ser Ile Trp
 1 5 10 15
 Leu Asp Asp Leu Ser Arg Thr Arg Ile Glu Ser Gly Ser Leu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Ile Lys Asp Lys Asn Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ser Ile
 35 40 45
 Phe Gln Lys Ala Leu Ser Gln Val Gly Pro Tyr Asp Ala Gln Leu Lys
 50 55 60
 Glu Leu Gly Lys Val Asp Val Glu Thr Ala Val Arg Glu Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Thr Asp Val Arg Asn Ala Thr Asp Ile Phe Arg Glu Ile Ala Glu Ala
 85 90 95
 Thr Asp Phe Val Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg Leu
 100 105 110
 Ala His Asp Thr Glu Asn Thr Glu Lys Gln Ala Val Glu Leu Trp Glu
 115 120 125
 Lys Val Asn Arg Pro Asn Ala Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Leu Glu
 130 135 140
 Gly Leu Pro Ala Ile Thr Ala Thr Leu Ala Lys Gly Ile Ser Val Asn
 145 150 155 160
 Val Thr Leu Ile Phe Ser Leu Glu Arg Tyr Glu Gln Val Ile Asp Ala
 165 170 175
 Tyr Ile Glu Gly Ile Ala Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Leu Lys
 180 185 190
 His Ile Gly Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Thr Ala
 195 200 205
 Val Asp Lys Leu Leu Glu Ala Asn Gly Ser Asp Glu Ala Lys Ala Leu
 210 215 220
 Glu Gly Lys Ala Ala Val Ala Asn Ala Arg Leu Ala Tyr Glu Leu Phe
 225 230 235 240
 Glu Lys Lys Phe Ala Ala Asp Pro Arg Trp Ala Asp Leu Ala Ala Lys
 245 250 255

Gly Ala Lys Val Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Thr Lys Asn
 260 265 270
 Ala Ala Tyr Ser Asp Cys Lys Tyr Val Asp Glu Leu Val Ala Lys His
 275 280 285
 Ile Val Asn Thr Met Pro Glu Lys Thr Leu Asn Ala Leu Ala Asp His
 290 295 300
 Gly Asn Gly Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Ser His Ala
 305 310 315 320
 Val Ile Asp Lys Leu Ala Glu Leu Gly Ile Asn Leu Lys Asp Val Thr
 325 330 335
 Asp Lys Leu Glu Ala Asp Gly Val Ala Ala Phe Ile Lys Ser Trp Asp
 340 345 350
 Ser Val Leu Ala Asp Val Gln Ser Gly Ile Asp Arg Val Asn Ala
 355 360 365

<210> 7

<211> 1931

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 7

Met Arg Lys Arg Val Val Ser Val Ala Leu Ala Val Ala Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Pro Leu Gly Val Gly Ser Thr Ala Ser Ala Ala Pro Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu Arg Ser Ala Ala Ser Ser Asn Asp
 35 40 45
 Ala Asn Ala Asn Asp Val Ala Thr Val Ala Asp Asp Ala Ala Val Asn
 50 55 60
 Gly Trp Thr Ile Asp Arg Asn Thr Ala Lys Gly Gly Glu Ile Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Gly Thr Gly Asp Tyr Ala Gly Trp Thr His Phe Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Ala Asn Gly Asn Ala Thr Ser Ser Ser Gly Tyr Pro Ala Val Ala Ile
 100 105 110

Ser Gly Lys Thr Ile Asp Leu Thr Arg Ala Gly Glu Phe Ser Ile Lys
 115 120 125
 Val Lys Ser Pro Gln Ala Gly Ser Ala Asn Arg Phe Gly Phe Tyr Leu
 130 135 140
 Gly Tyr Lys Asp Pro Gly Asn Ala Leu Phe Leu Gly Tyr Asp Lys Gly
 145 150 155 160
 Gly Trp Phe Trp Gln Lys Tyr Val Asp Gly Asn Gly Asp Trp Tyr Asn
 165 170 175
 Gly Thr Arg Val Ala Ala Pro Ala Ala Asn Ala Glu Ile Thr Val Asn
 180 185 190
 Val Ser Trp Thr Ala Ala Lys Val Ala Thr Leu Thr Ile Asp Gly Gln
 195 200 205
 Lys Ala Phe Asp Val Asp Tyr Ser Ser Met Thr Ala Leu Thr Asn Lys
 210 215 220
 Leu Ala Met Lys Ala Gly Ser Tyr Ser Gly Thr Ser Glu Val Thr Asp
 225 230 235 240
 Val Tyr Phe Lys Asn Phe Thr Val Gly Glu Val Ala Lys His Asn Val
 245 250 255
 Thr Gly Lys Val Val Asp Ala Ser Gly Ala Ala Ile Ala Gly Ala Glu
 260 265 270
 Val Val Thr Gly Lys Asn Ser Ala Thr Thr Ala Ala Asp Gly Thr Phe
 275 280 285
 Thr Leu Thr Gly Leu Ala Ala Gly Asp Tyr Thr Leu Thr Val Ser Ala
 290 295 300
 Glu Gly Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Val Thr Val Ala Asp Gly Asn
 305 310 315 320
 Ala Ser Val Gly Asn Ile Thr Leu Asn Lys Ser Ala Glu Val Ala Thr
 325 330 335
 Glu Thr Leu Ser Thr Ala Ala Met Asp Val Arg Val Lys Lys Asn Phe
 340 345 350
 Pro Ser Val Tyr Asp Tyr Thr Met Lys Lys Phe Gly Gly Lys Ile Met
 355 360 365
 Tyr Gly Gln Pro Lys Asp Val Arg Val Ile Thr Ile Asn Gly Thr Asp
 370 375 380

Val Thr Leu Lys Asp Ser Asp Val Thr Phe Lys Lys Val Ser Ala Thr
 385 390 395 400
 Glu Ala Gln Tyr Thr Leu Asn Val Lys Ser Gly Asn Lys Ile Asn Ala
 405 410 415
 Val Val Thr Val Gln Ile Lys Val Val Asp Asn Thr Leu Lys Leu Asn
 420 425 430
 Val Thr Lys Ile Val Asn Lys Ala Asp Asp Ala Lys Thr Glu Ala Glu
 435 440 445
 Glu Asn Pro Val Gln Thr Ile Ala Phe Pro Asn Gln Ser Leu Ile Ser
 450 455 460
 Val Arg Ser Gly Gln Asp Gly Ala Gln Phe Thr Gly Ala Arg Met Ser
 465 470 475 480
 Ser Asp Thr Ala Arg Pro Gly Asp Thr Asn Phe Gly Ile Thr Ala Asp
 485 490 495
 Thr Thr Val Gly Asn Ala Asn Asp Tyr Thr Tyr Gly Phe Val Ser Gly
 500 505 510
 Asn Gly Leu Ser Ala Gly Leu Trp Ser Asn Ser Glu His Asp Gly Thr
 515 520 525
 Thr Val Gly Asn Thr Val Ala Gly Gly Ala Arg Asn Thr Arg Val Leu
 530 535 540
 Thr Ser Thr Gln Lys Val Gly Lys Ala Thr Ser Phe Gly Leu Gly Thr
 545 550 555 560
 Ala Pro Trp Tyr Tyr His Arg Val Val Thr Asp Thr Lys Lys Arg Thr
 565 570 575
 Tyr Thr Val Glu Glu Thr Asp Met Pro Lys Met Ala Val Ala Ile Ala
 580 585 590
 Gly Asp Glu Asn Glu Asp Gly Thr Val Asn Trp Glu Asp Gly Ala Ile
 595 600 605
 Ala Tyr Arg Asp Ile Met Asn Asn Pro Tyr Lys Ser Glu Glu Val Pro
 610 615 620
 Glu Leu Val Ala Trp Arg Ile Ala Met Asn Phe Gly Ser Gln Ala Gln
 625 630 635 640
 Asn Pro Phe Leu Thr Thr Leu Asp Asn Val Lys Lys Val Ala Leu Asn
 645 650 655

Thr Asp Gly Leu Gly Gln Ser Val Leu Leu Lys Gly Tyr Gly Asn Glu
 660 665 670
 Gly His Asp Ser Gly His Pro Asp Tyr Gly Asp Ile Asn Thr Arg Ala
 675 680 685
 Gly Gly Ala Ala Asp Met Asn Thr Leu Met Glu Lys Gly Thr Glu Tyr
 690 695 700
 Gly Ala Arg Phe Gly Val His Val Asn Ala Ser Glu Met Tyr Pro Glu
 705 710 715 720
 Ala Lys Ala Phe Ser Glu Asp Met Val Arg Arg Asn Ser Ser Gly Gly
 725 730 735
 Leu Ser Tyr Gly Trp Asn Trp Leu Asp Gln Gly Ile Gly Ile Asp Gly
 740 745 750
 Ile Tyr Asp Leu Ala Ser Gly Met Arg Lys Ser Arg Phe Ala Asp Leu
 755 760 765
 Lys Ser Lys Val Gly Asp Asn Met Asp Phe Ile Tyr Leu Asp Val Trp
 770 775 780
 Gly Asn Asn Thr Ser Gly Ala Glu Asp Ser Trp Glu Thr Arg Lys Met
 785 790 795 800
 Ser Gln Met Ile Asn Gln Asn Gly Trp Arg Met Thr Thr Glu Trp Gly
 805 810 815
 Ala Gly Asn Glu Tyr Asp Ala Thr Phe Gln His Trp Ala Ala Asp Leu
 820 825 830
 Thr Tyr Gly Gly Ser Gly Met Lys Gly Glu Asn Ser Gln Val Met Arg
 835 840 845
 Phe Leu Arg Asn His Gln Lys Asp Ser Trp Val Gly Asp Tyr Pro Ser
 850 855 860
 Tyr Gly Gln Ala Ala Asn Ala Pro Leu Leu Gly Gly Tyr Ser Met Lys
 865 870 875 880
 Asp Phe Glu Gly Trp Gln Gly Arg Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Ile Arg
 885 890 895
 Asn Leu Tyr Thr His Asp Val Ser Thr Lys Phe Ile Gln His Phe Lys
 900 905 910
 Val Val Arg Trp Val Asn Ser Pro Leu Asp Ala Thr Ser Val Lys Asp
 915 920 925

Ala Ser Val Asn Asn Gly Asn Glu Gln Ile Thr Leu Lys Asp Asp His
 930 935 940
 Gly Asn Val Val Val Leu Ser Arg Gly Ser Asn Asp Thr Asn Asn Gly
 945 950 955 960
 Ala Tyr Arg Asn Arg Thr Ile Thr Leu Asn Gly Ile Thr Val Ala Ser
 965 970 975
 Gly Ala Val Ser Pro Gly Asn Ser Asn Thr Val Lys Gly Thr Glu Ser
 980 985 990
 Tyr Leu Leu Pro Trp Leu Trp Asp Val Asn Thr Gly Lys Leu Val Lys
 995 1000 1005
 Ser Ser Asp Glu Lys Leu Tyr His Trp Asn Thr Gln Gly Gly Thr Thr
 1010 1015 1020
 Glu Trp Thr Leu Pro Lys Asp Trp Gln Asn Leu Ala Ser Val Lys Val
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Gln Leu Thr Asp Gln Gly Lys Thr Asn Glu Lys Thr Val Ala Val
 1045 1050 1055
 Ser Gly Gly Lys Ile Ser Leu Thr Ala Glu Ala Glu Thr Pro Tyr Val
 1060 1065 1070
 Val Thr Lys Gly Ser Glu Lys Gln Ile Ser Val Lys Trp Ser Glu Gly
 1075 1080 1085
 Met His Val Val Asp Ala Gly Phe Asn Gly Gly Gln Asn Thr Leu Lys
 1090 1095 1100
 Asp Asn Trp Ala Val Ser Gly Thr Gly Lys Ala Glu Val Glu Gly Thr
 1105 1110 1115 1120
 Asn Asn Ala Met Leu Arg Leu Thr Gly Asp Val Lys Val Ser Gln Lys
 1125 1130 1135
 Leu Thr Asp Leu Thr Ala Gly Lys Arg Tyr Ala Ile Tyr Val Gly Val
 1140 1145 1150
 Asp Asn Arg Thr Asn Ser Pro Ala Lys Ile Thr Val Thr Asn Gly Thr
 1155 1160 1165
 Lys Val Leu Ala Thr Asn Glu Thr Gly Lys Ser Ile Ala Lys Asn Tyr
 1170 1175 1180
 Ile Lys Ala Tyr Gly His Asn Thr Tyr Ser Asn Thr Glu Gly Gly Ser
 1185 1190 1195 1200

Ser Tyr Phe Gln Asn Met Tyr Val Trp Phe Val Ala Pro Glu Ser Gly
 1205 1210 1215
 Asp Val Lys Val Thr Leu Ser His Ser Gly Ala Cys Asp Asn Thr Asp
 1220 1225 1230
 His Val Tyr Phe Asp Asp Val Arg Val Leu Glu Asn Gly Tyr Lys Gly
 1235 1240 1245
 Leu Thr Leu Asn Ala Asp Gly Thr Leu Lys Thr Leu Thr Asn Asp Phe
 1250 1255 1260
 Glu Asp Asn Ala Gln Gly Ile Trp Pro Phe Val Val Ser Gly Ser Glu
 1265 1270 1275 1280
 Gly Val Glu Asp Asn Arg Ile His Leu Ser Glu Leu His Ala Pro Phe
 1285 1290 1295
 Thr Gln Ala Gly Trp Asp Val Lys Lys Met Asp Asp Val Leu Asp Gly
 1300 1305 1310
 Lys Trp Ser Val Lys Ala Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Thr Leu Ile
 1315 1320 1325
 Tyr Gln Thr Ile Pro Gln Asn Val Lys Leu Glu Pro Gly Glu Thr Tyr
 1330 1335 1340
 Lys Val Ser Phe Lys Tyr Gln Ser Gly Ser Asp Asp Ile Tyr Ala Ile
 1345 1350 1355 1360
 Ala Thr Gly Asp Gly Glu Tyr Asn Ala Ser Thr Val Lys Leu Thr Asn
 1365 1370 1375
 Leu Lys Lys Ala Leu Gly Glu Asp Gly Thr Ala Glu Phe Glu Ile Thr
 1380 1385 1390
 Gly Ser Ile Thr Gly Asp Ser Trp Phe Gly Ile Tyr Ser Thr Ser Thr
 1395 1400 1405
 Ala Pro Asp Leu Gln Asn Thr Ser Asp Ser Ala Ala Ala Phe Gly Gly
 1410 1415 1420
 Tyr Lys Asp Phe Val Leu Asp Asp Leu Lys Val Glu His Val Ala Ser
 1425 1430 1435 1440
 Ala Glu Arg Thr Lys Ala Asp Ala Glu Ala Lys Leu Lys Glu Val Lys
 1445 1450 1455
 Asp Thr Tyr Asn Gly Lys Ser Gly Asp Tyr Ser Ala Glu Val Trp Thr
 1460 1465 1470

Thr Tyr Val Asn Thr Val Ala Glu Ile Glu Ala Leu Ile Ala Lys Asp
 1475 1480 1485
 Lys Pro Asp Tyr Thr Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Val Ala Leu Ala Glu
 1490 1495 1500
 Tyr Met Lys Asn Ala Pro Gly Asp Asp Ser Asn Asp Ala Tyr Asp Val
 1505 1510 1515 1520
 Ala Thr Asp Ala Tyr Thr Val Glu Ala Gly Ser Gln Gln Ala Leu Ser
 1525 1530 1535
 Gly Gly Asn Glu Gly Pro Ala Ser Leu Ala Gln Asp Gly Asn Ala Gly
 1540 1545 1550
 Thr His Trp His Thr Ser Trp Ser Ala Asn Ala Val Ser Ala Gly Thr
 1555 1560 1565
 Ala Trp Tyr Gln Phe Asn Leu Asn Glu Pro Thr Thr Ile Asp Gly Leu
 1570 1575 1580
 Arg Tyr Met Ala Arg Ser Gly Ser Ala Asn Ala Asn Gly Lys Ile Lys
 1585 1590 1595 1600
 Lys Tyr Lys Ile Thr Leu Thr Leu Ser Asp Gly Thr Thr Lys Asp Val
 1605 1610 1615
 Val Thr Asn Gly Thr Phe Thr Thr Thr Ser Gly Val Trp Gln Lys Val
 1620 1625 1630
 Lys Phe Asp Ala Val Lys Asn Val Thr Lys Val Arg Ile Thr Ala Leu
 1635 1640 1645
 Glu Thr Ala Gly Gln Ser Ala Gly Glu Val Asn Thr Tyr Ala Ser Ala
 1650 1655 1660
 Ala Glu Leu Arg Val Thr Thr Val Arg Asp Val Pro Ser Thr Glu Val
 1665 1670 1675 1680
 Lys Val Asn Lys Cys Asp Leu Gln Asn Leu Tyr Asp Asp Ala Ser Ala
 1685 1690 1695
 Leu Thr Glu Ala Thr Tyr Thr Ala Asp Thr Trp Lys Val Leu Val Ala
 1700 1705 1710
 Lys Arg Asp Ala Ala Lys Lys Val Leu Asp Asp Glu Asn Ala Thr Ala
 1715 1720 1725
 Tyr Asp Val Ala Leu Ala Tyr Gln Asn Leu Lys Asp Ala Ile Ala Ala
 1730 1735 1740

Leu Glu Glu Arg Val Asp Thr Ser Lys Leu Ala Gly Leu Val Ala Asp
 1745 1750 1755 1760
 Ala Glu Lys Leu Lys Glu Ser Ala Tyr Thr Lys Asp Ser Trp Ala Ala
 1765 1770 1775
 Phe Lys Lys Ala Leu Asp Ala Ala Lys Ala Val Leu Asn Asn Ala Asn
 1780 1785 1790
 Ala Thr Lys Ala Asp Val Asp Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Asn Ala Ala
 1795 1800 1805
 Met Lys Ala Leu Lys Pro Ala Ser Ser Lys Pro Thr Pro Asn Pro Glu
 1810 1815 1820
 Thr Thr Asp Lys Ser Lys Leu Gln Ala Thr Ile Asp Gln Ala Lys Ala
 1825 1830 1835 1840
 Leu Asp Leu Ser Gly Tyr Thr Lys Lys Ser Val Gln Ala Val Arg Asp
 1845 1850 1855
 Ala Leu Ala Lys Ala Gln Ser Val Leu Ala Asp Asp Asn Ala Thr Gln
 1860 1865 1870
 Ala Asp Ile Asp Ala Ala Gln Lys Ala Leu Ala Asp Ala Ile Ala Ala
 1875 1880 1885
 Leu Glu Lys Ala Asp Ala Asn Gly Asn Ala Ile Ser Lys Thr Gly Ala
 1890 1895 1900
 Asn Val Ala Val Ile Gly Met Ala Gly Met Met Leu Val Ala Ala Ala
 1905 1910 1915 1920
 Gly Ala Val Phe Ile Ala Arg Lys Arg Ala Glu
 1925 1930

<210> 8

<211> 316

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 8

Met Cys Thr Gly Val Arg Phe Ser Asp Asp Glu Gly Asn Met Tyr Phe
 1 5 10 15
 Gly Arg Asn Leu Asp Trp Ser Phe Ser Tyr Gly Glu Thr Ile Leu Val
 20 25 30
 Thr Pro Arg Gly Tyr Gln Tyr Asp Tyr Val Tyr Gly Ala Glu Gly Lys

<210> 9

<211> 432

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium bifidum*

<400> 9

Met Ala Ala Ile Glu Ser Val Tyr Ala Arg Gln Ile Leu Asp Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Ile Leu Asp Thr Glu Asp Gly Ala Glu
 20 25 30
 Gly Arg Gly Leu Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Glu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Trp Glu Arg Arg Asp Gly Asp Lys Ser Val Tyr Gly Gly Lys Gly Val
 50 55 60
 Leu Asn Ala Val Lys Ala Val Asn Glu Val Ile Ala Pro Lys Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Met Asp Ala Thr Asp Gln Arg Ala Leu Asp Asp Leu Met Ile Glu
 85 90 95
 Leu Asp Gly Thr Pro Asn Lys Gly Lys Leu Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110
 Gly Val Ser Leu Ala Ala Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ser Ala Glu Leu
 115 120 125
 Pro Leu Tyr Arg Tyr Ile Gly Gly Thr Asn Gly His Ile Leu Pro Val
 130 135 140
 Pro Asn Met Asn Ile Met Asn Gly Gly Ala His Ala Asp Phe Ala Thr
 145 150 155 160
 Asp Ile Gln Glu Tyr Met Ile Ser Pro Tyr Gly Phe Asp Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Glu Ala Leu Arg Ala Gly Val Glu Val Tyr His Thr Leu Lys Asn Val
 180 185 190
 Leu Lys Lys Glu Gly Leu Asn Thr Gly Leu Gly Asp Glu Gly Gly Phe
 195 200 205
 Ala Pro Lys Met Lys Ser Asn Glu Asp Ser Leu Lys Tyr Ile Met Asp
 210 215 220
 Ala Ile Ser Ala Ala Gly Tyr Glu Pro Gly Lys Gln Ile Gly Ile Cys
 225 230 235 240

