



(51) МПК

*A23C 9/12* (2006.01)*A23L 1/304* (2006.01)*C12N 1/18* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006127216/13, 26.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.07.2006

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2008

(45) Опубликовано: 20.09.2008 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 4530846 A, 23.07.1985. RU 2142504  
C1, 10.12.1999. RU 2269909 C2, 20.02.2006. RU  
2244745 C2, 20.01.2005.

Адрес для переписки:

670013, Республика Бурятия, г.Улан-Удэ, ул.  
Ключевская, 40в, стр.1, ВСГУ, ОИС

(72) Автор(ы):

Хамагаева Ирина Сергеевна (RU),  
Кузнецова Ольга Степановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
Восточно-Сибирский государственный  
технологический университет (RU),  
Хамагаева Ирина Сергеевна (RU)

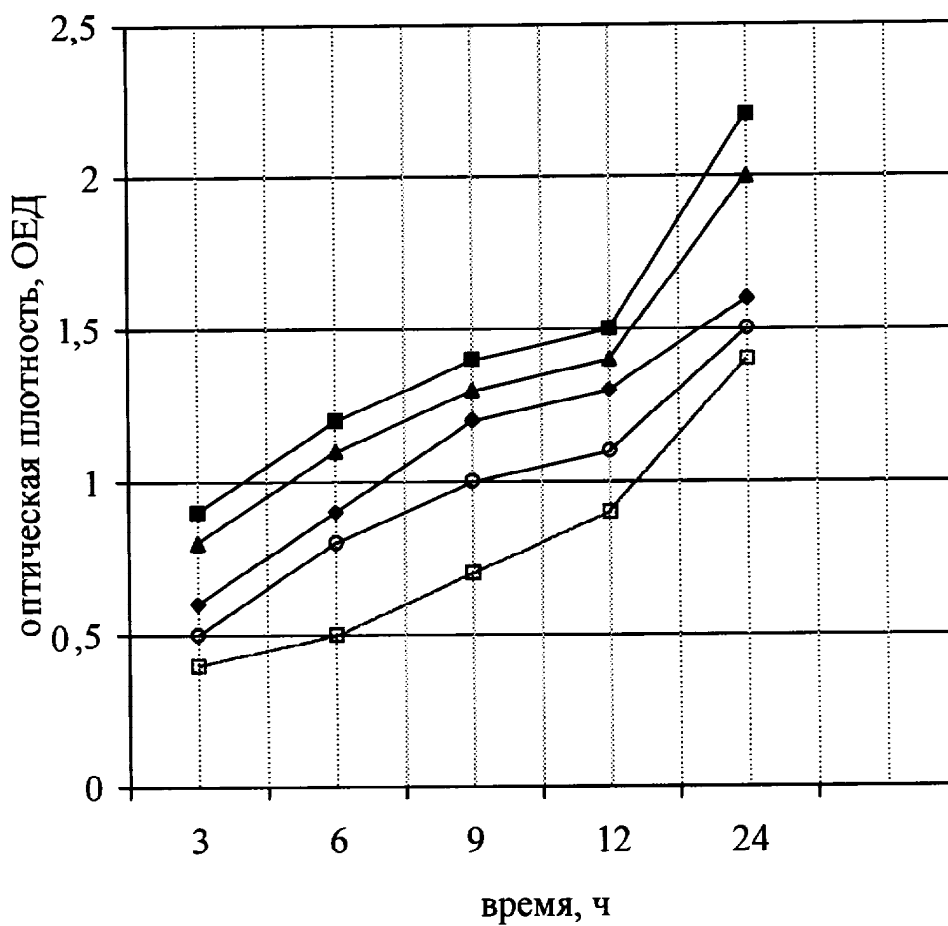
## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, а именно к биологически активным добавкам на основе молочного сырья и селена. Изобретение предусматривает приготовление питательной среды на основе осветленной творожной сыворотки, внесение 15-20 мкг/мл селенита натрия и инокулята и культивирование. В качестве инокулята используют активизированные культуры бифидобактерий *Bifidobacterium longum* штамм В

379 М или пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* штамм КМ 186. Изобретение позволяет получить пробиотические селенообогащенные биологически активные добавки, обладающие полифункциональными свойствами, повысить антимуtagenную активность микроорганизмов, увеличить количество экзополисахаридов в продукте, а также повысить биодоступность селена. 3 ил., 3 табл.

Влияние селенита натрия на нарастание биомассы бифидобактерий.



- ◆ контроль, без селена
- концентрация селенита натрия 5 мкг/мл
- ▲ концентрация селенита натрия 10 мкг/мл
- концентрация селенита натрия 15 мкг/мл
- концентрация селенита натрия 20 мкг/мл

Фиг. 1

RU 2 3 3 3 6 5 5

RU 2 3 3 3 6 5 5



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

**A23C 9/12** (2006.01)**A23L 1/304** (2006.01)**C12N 1/18** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006127216/13, 26.07.2006**(24) Effective date for property rights: **26.07.2006**(43) Application published: **10.02.2008**(45) Date of publication: **20.09.2008 Bull. 26**

Mail address:

**670013, Respublika Burjatija, g.Ulan-Udeh,  
ul. Ključevskaja, 40v, str.1, VSGTU, OIS**

(72) Inventor(s):

**Khamagaeva Irina Sergeevna (RU),  
Kuznetsova Ol'ga Stepanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
Vostočno-Sibirskij gosudarstvennyj  
tehnologičeskij universitet (RU),  
Khamagaeva Irina Sergeevna (RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING SELENIUM-CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

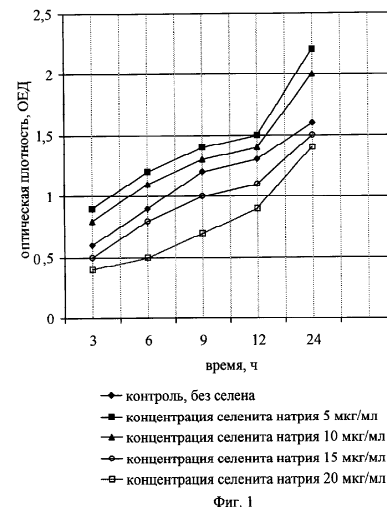
SUBSTANCE: invention relates to microbiological industry and technology, namely, to biologically active additives based on dairy raw materials and selenium. Invention includes preparation of nutritional medium based on cleared curd serum, introduction of 15-20 mkg/ml of sodium selenite and inoculant, and cultivation. As inoculant activated cultures of bifidobacteria *Bifidobacterium longum* strain B 379 M or propiono-acid bacteria *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanu* strain KM 186 are used.

EFFECT: production of probiotic selenium-enriched biologically active additives, which have polyfunctional properties; increased anti-mutagenic activity of microorganisms; greater amount of exopolysaccharides in the product;

enhanced bioavailability of selenium.

3 dwg, 3 tbl, 4 ex

Влияние селенита натрия на нарастание биомассы бифидобактерий.



Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, а именно к биологически активным добавкам на основе молочного сырья и селена.

Известен способ получения эукариотических микроорганизмов, обогащенных селеном, полученных путем культивирования дрожжей рода *Candida* на питательной среде, содержащей источник углерода, минеральные соли в присутствии селенсодержащего вещества. В качестве источника селенсодержащего вещества используют диоксид селена ( $\text{SeO}_2$ ).

Недостатком данного способа является использование в качестве источника селена  $\text{SeO}_2$ , являющегося летучим соединением, требующего дополнительных трудозатрат (Жильцова Т.С. Рост дрожжей на селенсодержащих средах и накопление селена в биомассе. Автореферат дис. на соиск. уч. степ, канд. биол. наук. - Ростов/Дон: 1995, с.6-12).

Наиболее близким по технической сущности к изобретению является способ получения селенсодержащих хлебопекарных дрожжей путем культивирования дрожжей *Saccharomyces* на питательной среде, содержащей источник углерода, в качестве которого используют мелассу, источники азота, фосфора, калия и серы в присутствии селенита натрия с последующим отделением дрожжей от среды, их промывкой от остатков среды и неусвоенного селена. Селенит натрия подается непрерывно в составе мелассы (пат. US 4530846, кл. 426/62, 1985 г.).

Недостатком данного способа является нестабильность содержания селена в дрожжах, что свидетельствует о неуправляемости процесса и невозможности получения конечного продукта с заранее заданной низкой концентрацией. Кроме того, необходимо постоянно следить за соотношением селена и серы в среде.

Общим недостатком известных способов производства является то, что дрожжи не обладают пробиотическими свойствами, не приживаются в желудочно-кишечном тракте и не устраняют дисбактериоз кишечника. Кроме того, высокое поступление хлебопекарных дрожжей в жизнеспособном состоянии в организм человека может вызвать бродильные процессы и дискомфорт в желудочно-кишечном тракте.

Анализ технического уровня по данной проблеме свидетельствует о том, что биологически активные добавки на основе пробиотических микроорганизмов, обогащенных селеном, отсутствуют.

Технической задачей, которая была поставлена при создании изобретения, является разработка способа производства биологически активных добавок на основе пропионовокислых бактерий и бифидобактерий, обогащенных селеном.

Технический результат, обеспечиваемый при осуществлении предлагаемого изобретения, заключается в создании пробиотических селенообогащенных БАДов, обладающих полифункциональными свойствами, повышении антимуtagenной активности микроорганизмов, увеличении количества экзополисахаридов в продукте, повышении биодоступности селена.

Следует отметить, что в современных условиях жизни пробиотики служат важным необходимым инструментом защиты человека, в первую очередь, от дисбактериозов желудочно-кишечного тракта, возникающих как следствие нерациональной антибиотикотерапии, перенесенных кишечных заболеваний, неправильного питания, стрессов и др.

Указанный выше технический результат при осуществлении изобретения достигается тем, что в известном способе приготовления селенсодержащей биологически активной добавки, предусматривающем приготовление питательной среды, внесение источника селена и инокулята, культивирование, согласно изобретению в качестве инокулята используют активизированные культуры бифидобактерий *Bifidobacterium longum* В 379М или пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* штамм КМ 186, при этом селенит натрия вносят в питательную среду в количестве 15-20 мкг/мл, а в качестве основы питательной среды используют осветленную творожную сыворотку.

Отличительными признаками заявляемого способа получения селенсодержащей биологически активной добавки являются новые условия культивирования

микроорганизмов, а именно использование в качестве инокулята активизированных культур бифидобактерий *Bifidobacterium longum* штамм В 379 М или пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* штамм КМ186. Нами была исследована устойчивость указанных микроорганизмов к селену с целью использования их при производстве селенсодержащей БАД. В ходе экспериментальных исследований было установлено, что бифидобактерии и пропионовокислые бактерии обладают высокой устойчивостью к селену. Результаты исследований представлены в таблицах 1 и 2.

Влияние селенита натрия на рост пропионовокислых бактерий				
Доза селенита натрия, мкг/мл	Количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>			
	Продолжительность культивирования, час			
	6	12	18	24
Контроль, без селена	8.10 <sup>6</sup>	8.10 <sup>9</sup>	2.10 <sup>10</sup>	4.10 <sup>12</sup>
5	3.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>10</sup>	5.10 <sup>10</sup>	6.10 <sup>12</sup>
10	9.10 <sup>6</sup>	9.10 <sup>9</sup>	1.10 <sup>10</sup>	7.10 <sup>12</sup>
15	1.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>8</sup>	9.10 <sup>9</sup>	8.10 <sup>12</sup>
20	8.10 <sup>6</sup>	7.10 <sup>9</sup>	3.10 <sup>10</sup>	3.10 <sup>12</sup>

Влияние селенита натрия на рост бифидобактерий				
Доза селенита натрия, мкг/мл	Количество жизнеспособных клеток бифидобактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>			
	Продолжительность культивирования, час			
	6	8	18	24
Контроль, без селена	8.10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>7</sup>	2.10 <sup>9</sup>	7.10 <sup>11</sup>
5	9.10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>7</sup>	3.10 <sup>9</sup>	8.10 <sup>11</sup>
10	2.10 <sup>5</sup>	3.10 <sup>7</sup>	4.10 <sup>8</sup>	9.10 <sup>11</sup>
15	1.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>7</sup>	3.10 <sup>8</sup>	6.10 <sup>11</sup>
20	9.10 <sup>4</sup>	9.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>8</sup>	3.10 <sup>11</sup>

Как видно из таблиц 1 и 2, внесение в питательную среду селенита натрия не снижает рост пробиотических микроорганизмов, количество жизнеспособных клеток остается на высоком уровне и к концу культивирования составляет 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> К.О.Е. в 1 см<sup>3</sup>. Следует отметить, что более высокую устойчивость к селену проявляют пропионовокислые бактерии.

С учетом удовлетворения суточной потребности взрослого человека в селене количество вносимого в питательную среду селенита натрия установлено из расчета 15-20 мкг/мл. При этом наблюдается активный рост микроорганизмов (см. фиг.1 и 2, табл.1 и 2).

Известно, что селенит-ионы при поступлении в клетку прокариот восстанавливаются до селеноводорода и его алкильных производных, которые затем включаются в серусодержащие аминокислоты, а затем в селенопротеины с образованием органических форм селена. Согласно современным представлениям селен поступает в клетку с участием тех же транспортных систем, что и сера, и включается в обмен серы, заменяя ее в метионине и цистеине. Применительно к остатку селеноцистеина механизм такого включения детально исследован. Установлено, что он определяется наличием в составе мРНК триплета UGA в сочетании со специфическим нетранслируемым петлевым фрагментом Se-CYS. В процессе включения остатка селеноцистеина в белок участвует специфическая сериновая UGA-тРНК длиной 95 нуклеотидов и 4 фактора трансляции Sel-A, B, C и D. У прокариот этот нуклеотидный участок расположен в непосредственной близости от триплета UGA в отличие от эукариот. Селенсодержащие белки входят в состав внутриклеточной гидрофильной макромолекулярной (белковой) фракции биомассы. Следует отметить, что селенометионин не синтезируется высшими организмами и единственным источником является биомасса дрожжей и прокариот. Вероятно этим объясняется способность бифидобактерий и пропионовокислых бактерий, как микроорганизмов прокариотической природы, накапливать селен.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что бифидобактерии и

пропионовокислые бактерии являются перспективными объектами для биотехнологического получения органических форм селена, что повышает его биодоступность и понижает токсичность.

Необходимо подчеркнуть, что большая часть селена в животных тканях присутствует в виде селенометионина и селеноцистеина.

В заявленном способе используются активизированные культуры бифидобактерий *Bifidobacterium longum* В 379М и пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* штамм КМ 186, которые являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта людей и оказывают благоприятное влияние на здоровье хозяина.

Бифидобактерии являются доминирующей микрофлорой кишечника взрослых и детей, выполняют ряд полезных для организма функций. Бифидобактерии оказывают положительное влияние на структуру слизистой оболочки кишечника и ее абсорбирующую способность. Они активно синтезируют для организма витамины группы В, рибофлавин, никотиновую кислоту, а также витамины С и К. Бифидобактерии образуют из неорганических азотистых соединений некоторые незаменимые аминокислоты - аланин, валин, аспаргин. Бифидофлора стимулирует также активность защитных систем хозяина. Видовой состав бифидофлоры зависит от возраста детей, характера вскармливания, а также состояния их здоровья. В заявленном способе используют штамм *B. longum*, который является доминирующей микрофлорой желудочно-кишечного тракта людей различных возрастных категорий.

Пропионовокислые бактерии относятся к семейству *Propionibacteriaceae*, к роду *Propionibacterium*, который включает 8 видов бактерий. В молочной промышленности, в частности в сыроделии наиболее часто используют *Propionibacterium freidereichii* subsp. *shermanii*.

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что обогащение пробиотических микроорганизмов в процессе культивирования с селенитом натрия способствует повышению их антимулагенной активности. Данные исследований представлены на фиг.3. Как видно из данных, представленных на фиг.3, при обогащении селеном антимулагенная активность пробиотических микроорганизмов повышается и достигает максимального значения 83% для пропионовокислых бактерий и 59,6% для бифидобактерий при концентрации селенита натрия 20 мкг/мл.

Также при обогащении селеном происходит накопление в продукте экзополисахаридов (ЭПС), обеспечивающих увеличение вязкости и влагоудерживающей способности биомассы, что повышает выход готового продукта. Данные представлены в таблице 3.

Как видно из табл.3, с увеличением концентрации селенита натрия в среде культивирования пробиотических микроорганизмов наблюдается постепенное увеличение концентрации экзополисахаридов и вязкости культуральной жидкости. Следует отметить, что биосинтез ЭПС у пропионовокислых бактерий выше на 67%, чем у бифидобактерий.

Концентрация селенита натрия, мкг/мл	Вязкость культуральной жидкости, сек/м <sup>2</sup>		Концентрация экзополисахаридов, мкг/мл	
	Бифидобактерии	Пропионовокислые бактерии	Бифидобактерии	Пропионовокислые бактерии
Контроль, без селена	3,16	4,63	7,5	12,5
10	3,62	5,32	13,75	22,1
15	4,05	6Д	15	24,9
20	4,69	6,5	23,75	38,5

Таким образом, внесение селенита натрия в питательную среду в количестве 15-20 мкг/мл повышает антимулагенные свойства пробиотических микроорганизмов и выход готового продукта.

В качестве основы питательной среды в заявляемом способе выбрана осветленная творожная сыворотка, которая является сравнительно дешевой и простой в приготовлении. Кроме того, творожная сыворотка содержит необходимые для культивирования пробиотических микроорганизмов факторы роста, аминокислоты, витамины и

микроэлементы.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что при наращивании биомассы пробиотических микроорганизмов в питательной среде на основе творожной сыворотки, содержащей селен, образуются селенсодержащие аминокислоты, 5 повышаются антимуtagenные свойства и экзополисахаридный потенциал бифидобактерий и пропионовокислых бактерий.

Проведенный заявителем анализ уровня техники, включающий поиск по патентным и научно-техническим источникам информации и выявление источников, содержащих сведения об аналогах заявленного изобретения, позволил установить, что заявитель не 10 обнаружил источник, характеризующийся признаками, тождественными всем существенным признакам заявленного изобретения. Определение из перечня выявленных аналогов прототипа, как наиболее близкого по совокупности признаков аналога, позволило установить совокупность существенных по отношению к усматриваемому заявителем 15 техническому результату отличительных признаков в заявленном способе, изложенных в формуле изобретения.

Следовательно, заявленное изобретение соответствует условиям «новизна» и «изобретательский уровень».

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом.

В качестве питательной среды для культивирования пробиотических микроорганизмов 20 используют осветленную творожную сыворотку, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар.

Устанавливают pH в пределах ( $7 \pm 0,1$ ). Затем стерилизуют при  $t=121^\circ\text{C}$ , охлаждают до температуры культивирования, вносят селенит натрия из расчета 15-20 мкг/мл, 3-5% активизированных культур бифидобактерий *B.longum* штамм В 379М или 25 пропионовокислых бактерий *P.shermanii* штамм КМ186.

Наращивание клеток бифидобактерий проводят при  $t=37^\circ\text{C}$ , пропионовокислых бактерий при  $t=30^\circ\text{C}$ , в течение 20-24 часов в условиях периодического культивирования при 30 однократной нейтрализации среды через 12 часов для поддержания pH на оптимальном уровне насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Полученную суспензию клеток охлаждают и разливают в асептических условиях в стерильные флаконы по 5 или 10 см<sup>3</sup>.

Укупоривают стерильно в асептических условиях резиновыми пробками, охлаждают до температуры  $4 \pm 2$  и хранят при этой температуре не более 90 суток.

Пример 1. Получение БАД «Селенбифивит».

В качестве питательной среды используют осветленную творожную сыворотку, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар.

Устанавливают pH=7. Затем стерилизуют при  $t=121^\circ\text{C}$ , охлаждают до  $t=37^\circ\text{C}$ , вносят 40 селенит натрия из расчета 15 мкг/мл, 5% активизированных культур бифидобактерий *B.longum* штамм В 379М.

Наращивание клеток бифидобактерий проводят при  $t=37^\circ\text{C}$  в течение 20 часов, в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Полученную 45 суспензию клеток охлаждают и разливают в асептических условиях в стерильные флаконы по 5 см.

Укупоривают стерильно в асептических условиях резиновыми пробками, охлаждают до температуры  $4 \pm 2$  и хранят при этой температуре не более 90 суток.

Пример 2. Получение БАД «Селенпропионикс».

В качестве питательной среды используют осветленную творожную сыворотку, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар.

Устанавливают pH=7,1. Затем стерилизуют при  $t=121^\circ\text{C}$ , охлаждают до  $t=30^\circ\text{C}$ , вносят

селенит натрия из расчета 15 мкг/мл, 5% активизированных культур пропионовокислых бактерий *P.shermanii* штамм КМ 186.

5 Наращивание клеток пропионовокислых бактерий осуществляют при  $t=30^{\circ}\text{C}$  в течение 20 часов, в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).  
Полученную суспензию клеток охлаждают и разливают в асептических условиях в стерильные флаконы по  $10\text{ см}^3$ .

Укупоривают стерильно в асептических условиях резиновыми пробками, охлаждают до температуры  $4\pm 2$  и хранят при этой температуре не более 90 суток

10 Пример 3. Получение БАД «Селенбифивит».

В качестве питательной среды используют осветленную творожную сыворотку, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар.

15 Устанавливают  $\text{pH}=7$ . Затем стерилизуют при  $t=121^{\circ}\text{C}$ , охлаждают до  $t=37^{\circ}\text{C}$ , вносят селенит натрия из расчета 20 мкг/мл, 3% активизированных культур бифидобактерий *B.longum* штамм В 379М.

Наращивание клеток бифидобактерий проводят при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).  
20 Полученную суспензию клеток охлаждают и разливают в асептических условиях в стерильные флаконы по 10 см.

Укупоривают стерильно в асептических условиях резиновыми пробками, охлаждают до температуры  $4\pm 2$  и хранят при этой температуре не более 90 суток.

25 Пример 4. Получение БАД «Селенпропионикс».

В качестве питательной среды используют осветленную творожную сыворотку, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар.

30 Устанавливают  $\text{pH}=7,1$ . Затем стерилизуют при  $t=121^{\circ}\text{C}$ , охлаждают до  $t=30^{\circ}\text{C}$ , вносят селенит натрия из расчета 20 мкг/мл, 3% активизированных культур пропионовокислых бактерий *P.shermanii* штамм КМ186.

Наращивание клеток пропионовокислых бактерий осуществляют при  $t=30^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).  
35 Полученную суспензию клеток. охлаждают и разливают в асептических условиях в стерильные флаконы по  $5\text{ см}^3$ .

Укупоривают стерильно в асептических условиях резиновыми пробками, охлаждают до температуры  $4\pm 2$  и хранят при этой температуре не более 90 суток.

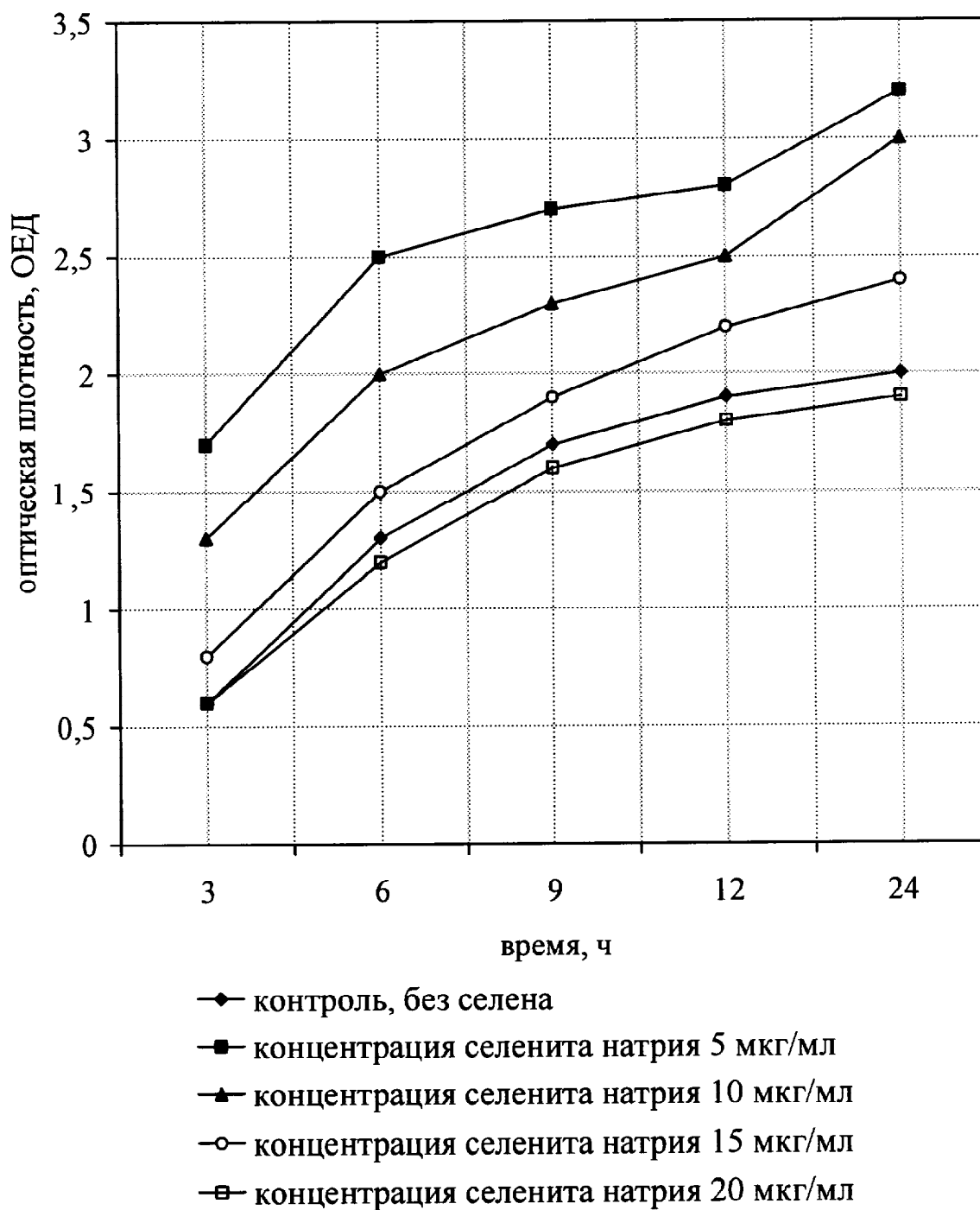
40 **Формула изобретения**

Способ получения селенсодержащей биологически активной добавки, предусматривающий приготовление питательной среды, внесение селенита натрия и инокулята, культивирование, отличающийся тем, что в качестве инокулята используют активизированные культуры бифидобактерий *Bifidobacterium longum* штамм В 379М или пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* штамм КМ186, при этом селенит натрия вносят в питательную среду в количестве 15-20 мкг/мл, а в качестве основы питательной среды используют осветленную творожную сыворотку.

50

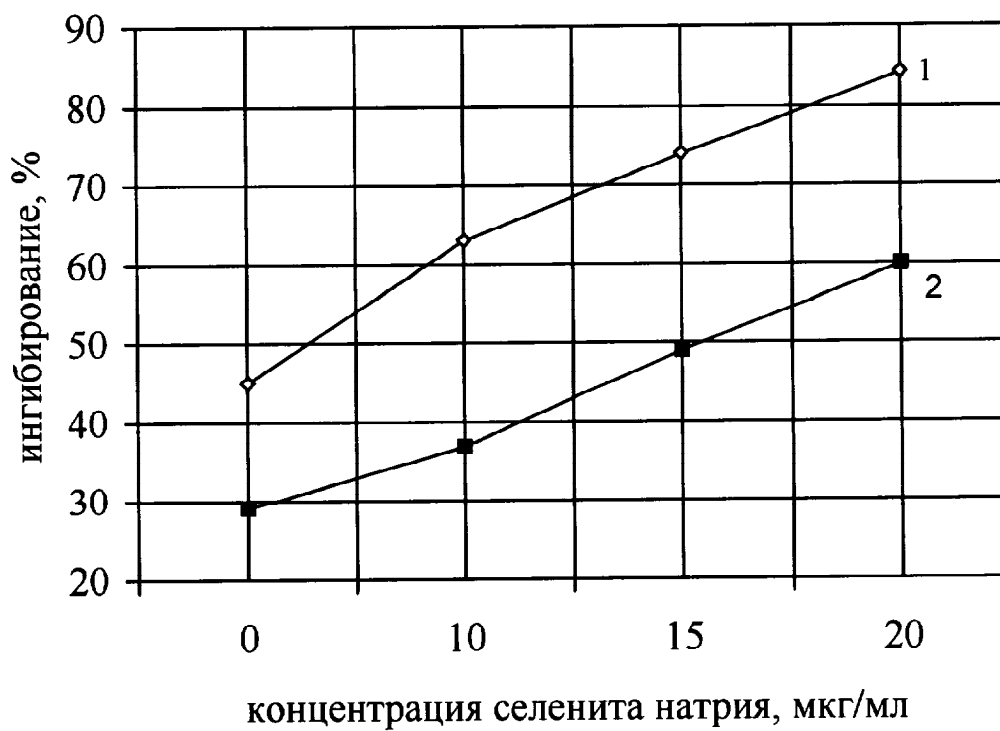


Влияние селенита натрия на  
наращивание биомассы пропионовокислых бактерий



Фиг. 2

Влияние селенита натрия на антимутагенную активность пропионовокислых бактерий (1), бифидобактерий (2).



Фиг. 3