

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047222**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.21

(21) Номер заявки
201991822

(22) Дата подачи заявки
2018.01.31

(51) Int. Cl. *A23K 1/00* (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(54) **МИКРОБНЫЕ КЛЕТКИ, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/452,804; 62/452,816; 62/510,723**

(32) **2017.01.31; 2017.01.31; 2017.05.24**

(33) **US**

(43) **2020.02.14**

(86) **PCT/US2018/016321**

(87) **WO 2018/144653 2018.08.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КАНЗАС СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН; АКСИОТА
Ю.Эс., ИНК. (US)**

(56) **US-A1-20060257372
US-A-4689226
US-A1-20140112897
US-A-5939303**

TEATHER et al.: Maintenance of Laboratory Strains of Obligately Anaerobic Rumen Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1982, Vol. 44, No. 2, pp. 499-501; page 499, column 1, fourth paragraph - column 2, third paragraph, Table 1; page 500, column 1, first paragraph

(72) Изобретатель:
**Друйяр Джеймс Скотт, Аперс
Селин Кэролин, Херрен Джина
Рае, Эллерман Тара Джо, Скалетти
Сиана Мэри, Ван Джордан Кэтрин,
Латтимер Джеймс Моррис, Бейер
Скотт (US), Увитуз Соланж (UG),
Доутхит Тереза Леа, Гункел Кристина
Дениз (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к микробным клеткам, включающим, но этим не ограничивая, клетки аэробных бактерий и клетки анаэробных бактерий, а также клетки дрожжевых грибов, и к способам получения этих клеток, к кормовым добавкам и композициям, включающим эти клетки, и к применению, включающему введение этих клеток животным.

B1

047222

047222

B1

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к клеткам бактерии *Megasphaera elsdenii*, к способам получения клеток бактерии *M. elsdenii*, к кормовым добавкам и композициям, включающим эти клетки, и к применению, включающему введение клеток животным, в том числе, например, для улучшения показателя их роста и/или состояния здоровья. Настоящее изобретение также относится к микробным клеткам, включающим, но этим не ограничивая, клетки аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов, и к способам получения микробных клеток, кормовых добавок и композиций, включающих микробные клетки, и к применению, включающему введение микробных клеток животным, в том числе, например, для улучшения показателя их роста и/или состояния здоровья.

Уровень техники

Бактерии *Megasphaera elsdenii* (то есть, *M. elsdenii*) представляют собой неподвижные грам-отрицательные диплококки, которые утилизируют лактат в качестве предпочтительного источника углерода и могут способствовать предотвращению ацидоза, который является распространенным расстройством пищеварения, поражающим каждый год миллионы голов крупного рогатого и молочного скота.

В случаях, когда крупный рогатый скот и другие жвачные животные поглощают большие количества крахмалсодержащих кормов (например, зерна злаков) или простых сахаров, условно-патогенные микроорганизмы в желудке могут быстро сбрасывать эти соединения в молочную кислоту. Молочная кислота является высокоактивной органической кислотой, и она может вызывать лактоацидоз, который может нарушать нормальное пищеварение и вызывать значительные повреждения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у жвачных животных. Страдающие лактоацидозом животные имеют неоптимальные функциональные показатели. И в наиболее острой форме лактоацидоз может вызывать необратимое поражение пищеварительной и дыхательной систем животного, а также повышать процент смертности животных.

Бактерии *M. elsdenii* могут способствовать регулированию лактоацидоза вследствие способности бактерии превращать молочную кислоту в летучие жирные кислоты (VFA; например, бутират, пропионат и ацетат), которые являются не представляющими опасности органическими соединениями. Но численность бактерий *M. elsdenii* в желудочно-кишечном тракте жвачных животных часто находится на слишком низком уровне, для того чтобы предотвращать риск возникновения ацидоза. В связи с этим, для увеличения степени колонизации *M. elsdenii* в желудочно-кишечном тракте жвачных животных, была разработана культура живых клеток из штамма *M. elsdenii* в жидкой питательной среде, Lactipro®, смотрите, например, патентный документ U.S. Patent № 7550139. Однако существуют практические ограничения, которые препятствовали широкому применению продуктов, содержащих *M. elsdenii*, включающие сложность поддержания анаэробных условий, которые необходимы для жизнеспособности продуктов *M. elsdenii*, и сложности транспортировки продуктов *M. elsdenii* от места их производства на место их конечного применения в течение 14 дней, так как по истечению этого срока жизнеспособность *M. elsdenii* в продукте значительно снижается.

Несмотря на то, что в патентном документе U.S. Patent № 4138498 в общих чертах обсуждается потенциальная возможность лиофилизации *M. elsdenii*, тем не менее, в этом патентном документе не предлагаются какие-либо способы промышленного получения лиофилизированных бактерий *M. elsdenii*, которые можно было бы использовать для преодоления существующих недостатков, ограничивающих возможность промышленного применения. Кроме того, по меньшей мере одна фирма недавно сообщила о том, что лиофилизация микроорганизмов, в том числе анаэробов, таких как *M. elsdenii*, не является подходящим способом для применения в промышленности, смотрите, например, патентный документ WO 2017/015022.

Следовательно, существует потребность в клетках бактерий *Megasphaera*, таких как клетки бактерий *Megasphaera elsdenii*, и в способах их получения, которые позволяли бы решить существующие в настоящий момент проблемы. Кроме того, существует также потребность в других микробных клетках, таких как клетки бактерий *Bifidobacterium*, таких как *B. breve*, *Lactobacillus*, таких как *L. plantarum*, *Bifidobacterium*, таких как *B. animalis subsp. lactis*, *Pediococcus*, таких как *P. acidilactici*,

Lactobacillus, таких как *L. casei*, *Bacillus*, таких как *B. subtilis*, *Saccharomyces*, таких как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*, и в способах их получения, которые бы позволяли решить существующие в настоящий момент проблемы.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*, включающему: (а) приготовление культуры в анаэробных условиях, включающей клетки *M. elsdenii*, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, сорбита, маннита, тростникового сахара, ксилитозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в анаэробных условиях, (c) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего по-

лучают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере два источника углерода состоят приблизительно на 50-90% из первого источника углерода и приблизительно на 10-50% из второго источника углерода, где второй источник углерода отличается от первого источника углерода, и где по меньшей мере два источника углерода состоят на 100% из первого источника углерода и второго источника углерода.

Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*, включающему: (а) приготовление культуры, включающей клетки *M. elsdenii*, и питательной среды, (б) сбор клеток в анаэробных условиях не позднее чем через 12 ч после того, как закончилась фаза экспоненциального роста культуры клеток, и до того, как началась фаза стационарного роста культуры клеток, (с) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают лиофилизированные клетки *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления, сбор клеток включает по меньшей мере один метод, выбранный из группы, состоящий из центрифугирования, фильтрации, диализа, обратного осмоса и их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления, фильтрация включает тангенциальную потоковую фильтрацию.

В конкретных вариантах осуществления, культура клеток включает жидкость, и где сбор клеток включает удаление от приблизительно 60% до приблизительно 100% жидкости.

В конкретных вариантах осуществления, замораживание проводят при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -210°C .

Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*, включающему: (а) приготовление культуры, включающей клетки *M. elsdenii*, и питательной среды, (б) сбор клеток, (с) замораживание клеток при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -210°C не позднее чем через 5 ч после сбора, и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают лиофилизированные клетки *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления замораживание включает контактирование контейнера, содержащего клетки *M. Elsdenii*, с жидким азотом.

В конкретных вариантах осуществления замораживание включает контактирование клеток с жидким азотом.

В конкретных вариантах осуществления замораживание проводят при температуре приблизительно -196°C и получают замороженные осадки, включающие клетки, и где диаметр замороженных осадков составляет от приблизительно 0,0254 до приблизительно 12,7 мм (от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,5 дюйма).

В конкретных вариантах осуществления величина pH культуры клеток *M. elsdenii* перед их сбором составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,0.

В конкретных вариантах осуществления, от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdenii* остаются жизнеспособными после хранения при температуре приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 2 недель.

В конкретных вариантах осуществления, от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdenii* остаются жизнеспособными после хранения при температуре приблизительно 4°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В конкретных вариантах осуществления, культура дополнительно включает по меньшей мере один криопротектор.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один криопротектор выбирают из группы, состоящей из фруктозы, глюкозы, сахарозы, порошкового молока, детской молочной смеси, обезжиренного молока, трегалозы, мальтодекстрина, бетаина и их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один криопротектор присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 20% (в отношении веса к объему) в расчете от суммарного объема культуры клеток.

В конкретных вариантах осуществления лиофилизированные клетки *M. elsdenii* производят в промышленном масштабе.

В конкретных вариантах осуществления объем культуры клеток составляет по меньшей мере приблизительно 50 л.

В конкретных вариантах осуществления от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г клеток *M. elsdenii* сохраняют жизнеспособность после лиофилизации.

В конкретных вариантах осуществления клетки в культуре состоят из клеток *M. elsdenii*.

Настоящее изобретение относится к твердой кормовой добавке, включающей лиофилизированные клетки *M. Elsdenii*, полученные любым из упомянутых выше способов.

В конкретных вариантах осуществления твердая кормовая добавка дополнительно включает еще один микроорганизм.

В конкретных вариантах осуществления твердую кормовую добавку выбирают из группы, состоящей из порошка, гранулята, твердых частиц, брикета, жмыха или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления твердая кормовая добавка является пробиотиком.

Настоящее изобретение относится к композиции, включающей лиофилизированные клетки *M. Elsdeni*, полученные любым из упомянутых выше способов, или любую из упомянутых выше кормовых добавок.

В конкретных вариантах осуществления композиция представляет собой капсулу.

Настоящее изобретение относится к набору, включающему лиофилизированные клетки *M. elsdeni*, полученные любым из упомянутых выше способов, любую из упомянутых выше кормовых добавок или любую из упомянутых выше композиций.

Настоящее изобретение относится к способу введения клеток *M. elsdeni* животному, включающему введение животному лиофилизированных клеток *M. Elsdeni*, полученных любым из упомянутых выше способов, любой из упомянутых выше кормовых добавок или любой из упомянутых выше композиций.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения состояния или расстройства, связанного с продукцией молочной кислоты в желудочно-кишечном тракте животного, включающему введение животному эффективного количества лиофилизированных клеток *M. Elsdeni*, полученных любым из упомянутых выше способов, любой из упомянутых выше кормовых добавок или любой из упомянутых выше композиций.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ацидоз.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой рубцовый ацидоз.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой респираторное заболевание.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ламинит.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой инфекцию.

В конкретных вариантах осуществления инфекция вызвана сальмонеллой или кампилобактером.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или снижения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного, включающему введение животному эффективного количества лиофилизированных клеток *M. Elsdeni*, полученных любым из упомянутых выше способов, любой из упомянутых выше кормовых добавок или любой из упомянутых выше композиций.

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм является патогенным.

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм представляет собой сальмонеллу или кампилобактер.

Настоящее изобретение относится к способу повышения биодоступности содержащегося в растениях фосфора в рационе животного, включающему введение животному эффективного количества лиофилизированных клеток *M. Elsdeni*, полученных любым из упомянутых выше способов, любой из упомянутых выше кормовых добавок или любой из упомянутых выше композиций.

Настоящее изобретение относится к способу улучшения показателя роста у животного, включающему введение животному эффективного количества лиофилизированных клеток *M. Elsdeni*, полученных любым из упомянутых выше способов, любой из упомянутых выше кормовых добавок или любой из упомянутых выше композиций, где улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления лиофилизированные клетки *M. elsdeni*, твердую кормовую добавку или композицию вводят до, одновременно или после кормления животного кормом.

В конкретных вариантах осуществления способ дополнительно включает смешение лиофилизированных клеток *M. elsdeni* или твердой кормовой добавки с жидкостью перед введением.

В конкретных вариантах осуществления жидкость вводят перорально или путем обрызгивания животного жидкостью.

В конкретных вариантах осуществления введение включает одноразовое введение клеток *M. elsdeni*, кормовой добавки или композиции.

В конкретных вариантах осуществления введение включает ежедневное введение клеток *M. elsdeni*, кормовой добавки или композиции.

В конкретных вариантах осуществления введение включает более чем одно введение клеток *M. elsdeni*, кормовой добавки или композиции в течение одного дня.

В конкретных вариантах осуществления животное представляет собой жвачное животное.

В конкретных вариантах осуществления жвачное животное выбирают из группы, состоящей из крупного рогатого скота, овец, коз, оленей, буйволов и северных оленей.

В конкретных вариантах осуществления животное представляет собой нежвачное животное.

В конкретных вариантах осуществления нежвачное животное выбирают из группы, состоящей из лошади, домашних птиц и свиней.

В конкретных вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу.

В конкретных вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из курицы, гуся, утки, перепелки, индейки или голубя.

В конкретных вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из бройлера, племенного бройлера и курицы-несушки.

В конкретных вариантах осуществления домашняя птица представляет собой курицу.

В конкретных вариантах осуществления животное представляет собой лошадь.

В конкретных вариантах осуществления лошади представляют собой лошадь, пони, осла или мула.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения состояния или расстройства, связанного с продукцией молочной кислоты в желудочно-кишечном тракте домашней птицы, включающему введение домашней птице эффективного количества клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ацидоз.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой респираторное заболевание.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой инфекцию.

В конкретных вариантах осуществления инфекция вызвана сальмонеллой или кампилобактером.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или снижения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте домашней птицы, включающему введение домашней птице эффективного количества клетки *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм является патогенным

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм представляет собой сальмонеллу или кампилобактер.

Настоящее изобретение относится к способу повышения биодоступности содержащегося в растениях фосфора в рационе домашней птицы, включающему введение домашней птице эффективного количества клеток *M. elsdenii*.

Настоящее изобретение относится к способу улучшения показателя роста у домашней птицы, включающему введение домашней птице эффективного количества клеток *M. elsdenii*, где улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, яйценоскости, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из курицы, гуся, утки, перепелки, индейки или голубя.

В конкретных вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из бройлера, племенного бройлера и курицы-несушки.

В конкретных вариантах осуществления домашняя птица представляет собой курицу.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения состояния или расстройства, связанного с продукцией молочной кислоты в желудочно-кишечном тракте лошади, включающему введение лошади эффективного количества клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ацидоз.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой респираторное заболевание.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ламинит.

В конкретных вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой инфекцию.

В конкретных вариантах осуществления инфекция вызвана сальмонеллой или кампилобактером.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или снижения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте лошади, включающему введение лошади эффективного количества клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм является патогенным.

В конкретных вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм представляет собой сальмонеллу или кампилобактер.

Настоящее изобретение относится к способу повышения биодоступности содержащегося в растениях фосфора в рационе лошади, включающему введение лошади эффективного количества клеток *M. elsdenii*.

Настоящее изобретение относится к способу улучшения показателя роста у лошади, включающему введение лошади эффективного количества клеток *M. elsdenii*, где улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления лошади представляют собой лошадь, пони, осла или мула.

В конкретных вариантах осуществления кормовая добавка включает клетки *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления кормовая добавка представляет собой порошок, гранулят, твердые частицы, брикет, жмых, жидкость, гель или их комбинации.

В конкретных вариантах осуществления композиция включает клетки *M. elsdenii* или кормовую добавку, включающую эти клетки.

В конкретных вариантах осуществления композиция представляет собой капсулу.

В конкретных вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* являются лиофилизированными клетками.

В конкретных вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* вводят в жидкость.

В конкретных вариантах осуществления способ дополнительно включает регидратирование кормовой добавки или лиофилизированных клеток с получением жидкости.

В конкретных вариантах осуществления жидкость вводят перорально через желудочный зонд или путем опрыскивания животного этой жидкостью.

В конкретных вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* вводят до, одновременно или после кормления животного кормом.

В конкретных вариантах осуществления введение включает одноразовое введение клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления введение включает ежедневное введение клеток *M. elsdenii*.

В конкретных вариантах осуществления введение включает более чем одно введение клеток *M. elsdenii* в течение одного дня.

Настоящее изобретение относится к способу получения инкапсулированных лиофилизированных клеток *Megasphaera*, включающему: (а) приготовление культуры в анаэробных условиях, включающей клетки *Megasphaera*, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, сорбита, маннита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в анаэробных условиях, (c) замораживание клеток, (d) лиофилизацию клеток и (e) инкапсулирование клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г инкапсулированных лиофилизированных клеток *Megasphaera*.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение животному инкапсулированных лиофилизированных клеток *Megasphaera*.

В конкретных вариантах осуществления способ улучшения показателя роста у животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных клеток *Megasphaera*.

В конкретных вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления способ предотвращения или уменьшения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных клеток *Megasphaera*.

В конкретных вариантах осуществления композиция включает инкапсулированные лиофилизированные клетки *Megasphaera*.

Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток, включающему: (а) приготовление культуры в анаэробных условиях или частично анаэробных условиях, включающей анаэробные бактериальные клетки, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в анаэробных условиях или частично анаэробных условиях, (c) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение животному лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления способ улучшения показателя роста у животного включает введение животному эффективного количества лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увели-

чение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления способ предотвращения или уменьшения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного включает введение животному эффективного количества лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления композиция включает лиофилизированные анаэробные бактериальные клетки.

Настоящее изобретение относится к способу получения инкапсулированных лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток, включающему: (а) приготовление культуры в анаэробных условиях или частично анаэробные условия, включающей анаэробные бактериальные клетки, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилиты, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрина, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в анаэробных условиях или частично анаэробных условиях, (c) замораживание клеток, (d) лиофилизацию клеток и (e) инкапсулирование клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г инкапсулированных лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение животному инкапсулированных лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления способ улучшения показателя роста у животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления способ предотвращения или уменьшения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления композиция включает инкапсулированные лиофилизированные анаэробные бактериальные клетки.

Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов, включающему: (а) приготовление культуры в аэробных условиях, включающей аэробные бактериальные клетки и/или клетки дрожжевых грибов, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилиты, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрина, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток, (c) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение животному лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления способ улучшения показателя роста у животного включает введение животному эффективного количества лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления способ предотвращения или уменьшения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного включает введение животному эффективного количества лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления композиция включает лиофилизированные аэробные бактериальные клетки и/или клетки дрожжевых грибов.

Настоящее изобретение относится к способу получения инкапсулированных лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов, включающему: (а) приготовление

культуры в аэробных условиях, включающей аэробные бактериальные клетки и/или клетки дрожжевых грибов, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в аэробных условиях, (c) замораживание клеток, (d) лиофилизацию клеток и (e) инкапсулирование клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г инкапсулированных лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение животному инкапсулированных лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления, способ улучшения показателя роста у животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления способ предотвращения или уменьшения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного включает введение животному эффективного количества инкапсулированных лиофилизированных аэробных бактериальных клеток и/или клеток дрожжевых грибов.

В конкретных вариантах осуществления, композиция включает инкапсулированные лиофилизированные аэробные бактериальные клетки и/или клетки дрожжевых грибов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 графически представлены данные по влиянию температуры хранения на жизнеспособность жидких культур *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 в течение периода 28 дней, определяемую по выходу клеток *M. Elsdenii*, выраженному в колониеобразующих единицах на миллилитр ("КОЕ/мл"), отложенных на десятичной логарифмической (" \log_{10} ") шкале.

На фиг. 2 графически представлены данные по жизнеспособности жидких культур *M. elsdenii* NCIMB 41125 после 0, 7, 14, 21 и 28 дней хранения при комнатной температуре, определяемой по выходу клеток *M. elsdenii* в КОЕ/мл, отложенных на \log_{10} шкале.

На фиг. 3 схематически изображена система для тангенциальной поточной фильтрации ("TFF").

На фиг. 4 графически представлены данные по выходу клеток *M. elsdenii* в КОЕ/мл ретентата на у-оси в \log_{10} масштабе после проведения обработки в системе TFF. На x-оси указаны уменьшения объема на 70%, 80% или 90% после обработки в системе. "Ожидаемая величина" относится к теоретическому извлечению клеток *M. elsdenii* после обработки методом TFF. "Концентрация" относится к фактическому извлечению клеток *M. elsdenii* в ретентат, которая представляет собой объем концентрированных клеток, оставшийся после обозначенных уменьшений объема.

На фиг. 5 графически представлены данные по потере клеток после замораживания клеток при -80°C или в жидком азоте (LiqN) и лиофилизации клеток с использованием медленного (38 часов при давлении 0,135 мм рт.ст.) или быстрого (18,5 часов при давлении 0,250 мм рт.ст.) цикла. Клетки были из ретентатов после уменьшения объема на 70, 80 или 90% путем обработки методом TFF культур, содержащих в качестве криопротекторов либо 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (M/SM), либо 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (T/SM).

На фиг. 6 графически представлены данные по выходу клеток *M. elsdenii* NCIMB 41125 после начального быстрого (жидкий азот) или медленного (-20°C) замораживания и затем лиофилизации (в присутствии 15% мальтодекстрина и 0 или 7,5% трегалозы).

На фиг. 7 графически представлены данные по потере клеток, наблюдаемой для клеток *M. elsdenii* NCIMB 41125, заморожены в присутствии или отсутствии 4% трегалозы или 7,5% обезжиренного молока либо при -80°C , либо в жидком азоте (LiqN).

На фиг. 8 графически представлены данные по потере клеток, наблюдаемой для лиофилизированных образцов, полученных из ретентата с 90% уменьшением объема, смешанных с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (T/SM) или с 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (M/SM), замороженных при -80°C или в жидком азоте (LiqN), и лиофилизированных с использованием быстрого цикла и хранимых при комнатной температуре или 4°C в анаэробных условиях в течение вплоть до 24 недель.

На фиг. 9 графически представлены данные по потере клеток, наблюдаемой для лиофилизированных образцов, полученных из ретентата с 90% уменьшением объема, смешанных с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (T/SM) или с 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (M/SM), замороженных при -80°C или в жидком азоте (LiqN), и лиофилизированных с использованием быстрого цикла и хранимых при комнатной температуре или 4°C в анаэробных условиях в течение 24 недель. Столбики на

диаграмме без приведенного наверху единого индекса означают статистическое различие, $P < 0,02$.

На фиг. 10 представлены кривые роста для нелиофилизированного или регидратированного лиофилизированного продукта, полученного из ретентата с 90% уменьшением объема, смешанного с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (T/SM) или 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (M/SM), замороженного в жидком азоте (LiqN), и лиофилизированного с использованием быстрого цикла, после 12, 16, 20 или 24 недель хранения в анаэробных условиях при 4 или 25°C. Оптическая плотность (OD) приведена при длине волны 600 нанометров (нм), которую измеряли в период времени от 0 до 20 ч. Желтые линии=нелиофилизированный продукт, красные линии=T/SM, голубые линии=M/SM, пунктирные линии=хранение при 4°C и сплошные линии=хранение при 25°C.

На фиг. 11 графически представлены данные для клеток *M. elsdenii* в КОЕ на грамм ("КОЕ/г") в \log_{10} масштабе из флаконов с лиофилизированными клетками, хранимых при 4°C в течение вплоть до 11 месяцев. Каждая экспериментальная точка соответствует среднему выходу для 3 флаконов из 2 различных опытов по лиофилизации (суммарно 6 флаконов).

На фиг. 12 графически представлены данные по концентрации *M. elsdenii* (КОЕ/поголовье/день) в лиофилизированном продукте, вводимым ежедневно в качестве подкормки (то есть, подкормки, добавляемой в корм животного путем смешения с кормом или помещения подкормки поверх корма). Неделя, в течение которой проводился отбор образцов, указана на x-оси, эффект пробы, $P < 0,0001$. Сплошная горизонтальная линия представляет ожидаемую концентрацию *M. elsdenii* (КОЕ/поголовье/день) при ежедневном введении.

На фиг. 13 графически представлены данные по концентрации *M. elsdenii* в измельченном зерне, в которое в качестве подкормки добавлен лиофилизированный продукт, подвергнутом воздействию в течение времени от 0 до 4 ч атмосферных условий в лаборатории при комнатной температуре в отсутствие прямого воздействия лучей солнца (внутри помещения) или вне помещения при средних дневных температурах вплоть до 35°C при прямом воздействии солнечных лучей (вне помещения). Комбинированное воздействие времени и условий хранения, $P=0,0007$; продолжительность воздействия, $P < 0,0001$; воздействие условий хранения, $P < 0,0001$.

На фиг. 14 графически представлены данные по концентрации эндотоксина (единиц эндотоксина/мл) в образцах рубцовой жидкости (измеряемой в качестве индикатора бактериального лизиса в рубце), полученные через 26 ч после первого кормления для каждой группы: контрольная группа (не получала *M. elsdenii*), группа с нелиофилизированными клетками (получала 50 мл жидкой культуры *M. Elsdenii*, содержащей 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), группа с регидратированной культурой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), и группа с подкормкой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*, и также получала лиофилизированный продукт *M. elsdenii*, вводимый в качестве ежедневной подкормки, содержащий 10^8 КОЕ *M. elsdenii*). Воздействие подкормки, $P=0,3462$.

На фиг. 15 графически представлены данные по величине pH рубцовой жидкости, измеряемой с интервалами в 1 ч, для каждой группы: контрольная группа (не получала *M. elsdenii*), группа с нелиофилизированными клетками (получала 50 мл жидкой культуры *M. Elsdenii*, содержащей 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), группа с регидратированной культурой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), и группа с подкормкой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*, и также получала лиофилизированный продукт *M. elsdenii*, вводимый в качестве ежедневной подкормки, содержащий 10^8 КОЕ *M. elsdenii*). Комбинированное воздействие подкормки и количества дней, $P < 0,001$, воздействие подкормки, $P < 0,001$, воздействие количества дней, $P < 0,001$. Стандартная ошибка среднего значения (SEM) = 0,041.

На фиг. 16 графически представлены данные по величине оптической плотности при 600 нм полуопределенной лактатной среды, инокулированной с помощью рубцовой жидкости, для каждой группы: контрольная группа (не получала *M. elsdenii*), группа с нелиофилизированными клетками (получала 50 мл жидкой культуры *M. Elsdenii*, содержащей 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), группа с регидратированной культурой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), и группа с подкормкой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*, и также получала лиофилизированный продукт *M. elsdenii*, вводимый в качестве ежедневной подкормки, содержащий 10^8 КОЕ *M. elsdenii*). Комбинированное воздействие подкормки и времени, $P < 0,02$; воздействие подкормки, $P < 0,01$; воздействие времени, $P < 0,01$. SEM=0,04.

На фиг. 17 показаны изменения концентрации L-лактата (мМ) в полуопределенной лактатной среде, инокулированной с помощью смеси рубцовых микробов, для каждой группы: контрольная группа (не получала *M. elsdenii*), группа с нелиофилизированными клетками (получала 50 мл жидкой культуры *M. elsdenii*, содержащей 10^{10} КОЕ *M. elsdenii*), группа с регидратированной культурой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10}

КОЕ М. elsdonii), и группа с подкормкой (получала лиофилизированную культуру, которую регидратировали непосредственно перед введением, содержащую 10^{10} КОЕ М. elsdonii, и также получала лиофилизированный продукт М. elsdonii, вводимый в качестве ежедневной подкормки, содержащий 10^8 КОЕ М. elsdonii). ^{a, b, c} столбики на диаграмме с различными с верхними индексами статистически отличаются друг от друга, $P < 0, 05$.

На фиг. 18 графически представлены данные по фитазной активности клеток *Megasphaera elsdonii* NCIMB 41125. На х-оси указаны образцы клеток, взятых из культур *Megasphaera elsdonii* NCIMB 41125 от начала культивирования ("0" часов) и далее с интервалами через 2 часа, то есть, в "2," "4," "6" и "8" часов после начала культивирования. Фитазная активность отложена на у-оси в виде количества неорганического фосфора, высвобождаемого из осадков клеток образцов, в микромолях в минуту ("мкмоль высвобождаемого Р/мин"). Фитазная активность клеток, культивируемых в среде, содержащей неорганический фосфат (KH_2PO_4), показана в светло-сером цвете, а фитазная активность клеток, культивируемых в среде, содержащей фитат, показана в темно-сером цвете.

На фиг. 19 графически представлены данные по влиянию *Megasphaera elsdonii* на концентрацию сальмонеллы в образцах слепой кишки, взятых у бройлерных цыплят в возрасте 15 дней. На х-оси указаны обработка с помощью *Megasphaera elsdonii* ("контроль"), неограниченный свободный доступ к кормушкам-бутылкам, содержащим жидкую культуру *Megasphaera elsdonii* ("неограниченно"), ежедневно лиофилизированные *Megasphaera elsdonii* ("лиофилизированные"), или пероральное введение через желудочный зонд жидкой культуры *Megasphaera elsdonii* в день 0. На у-оси указана концентрация сальмонеллы в колониеобразующих единицах на миллилитр (КОЕ/мл) в \log_{10} масштабе для подвергающихся обработке групп.

На фиг. 20 графически представлены данные по распространенности сальмонеллы в образцах слепой кишки, взятых у бройлерных цыплят в возрасте 15 дней. На х-оси указаны подвергающиеся обработке группы. На у-оси указан процент образцов слепой кишки, которые давали положительный результат по сальмонелле.

На фиг. 21 графически представлены данные по соотношению между приростом массы и затратами кормов (у-ось) у бройлерных цыплят в возрасте 18 дней, не подвергавшихся обработке с помощью *Megasphaera* ("контроль") или подвергавшихся обработке с помощью лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdonii* ("лиофилизированные"). Соотношению между приростом массы и затратами кормов представляет собой отношение суммарного количества съеданного корма к суммарному увеличению массы.

На фиг. 22 графически представлены данные по величине рН в образцах слепой кишки, взятых у лошадей, не подвергавшихся обработке с помощью *Megasphaera* ("контроль"), подвергавшихся пероральному вливанию *Megasphaera elsdonii* ("вливание") в день 1 из каждого 7 дней периода обработки или ежедневной обработке с помощью лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdonii* ("лиофилизированные").

На фиг. 23 графически представлены данные по росту штаммов М. elsdonii (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 и NCIMB 702410) в полуопределенной среде, содержащей 70% лактата и 30% глюкозы.

На фиг. 24 графически представлены данные по росту штаммов М. elsdonii (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 и NCIMB 702410) в полуопределенной среде, содержащей 60% лактата и 40% глюкозы.

На фиг. 25 графически представлены данные по росту штаммов М. elsdonii (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 и NCIMB 702410) в полуопределенной среде, содержащей 40% лактата и 60% глюкозы.

На фиг. 26 графически представлены данные по стабильности лиофилизированных М. Elsdonii, инкапсулированных с использованием метода 2 и хранимых при комнатной температуре в аэробной среде.

На фиг. 27 графически представлены данные по стабильности лиофилизированных М. Elsdonii, инкапсулированных с использованием метода 3 и хранимых при комнатной температуре в аэробной среде.

На фиг. 28 графически представлены данные по концентрации М. elsdonii NCIMB 41125 (\log_{10} КОЕ/пакет) в лиофилизированном продукте, хранимом в пакете из полиэтилентерефталата с мальтодекстрином (М.е. + мальтодекстрин) или без мальтодекстрина (М.е.) при $4,4^\circ\text{C}$ или 24°C .

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к клеткам *Megasphaera elsdonii*, к способам получения клеток М. elsdonii, к кормовым добавкам и композициям, включающим эти клетки, и к применению, включающему введение этих клеток животным, в том числе, например, для улучшения показателя роста и/или здоровья. Настоящее изобретение также относится к микробным клеткам, включающим, но этим не ограничивая, клетки аэробных бактерий, анаэробных бактерий и клетки дрожжевых грибов, и, например, клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis* subsp. *lactis*, *Pediosoccus*, такие как *P. acidilactici*, *Lactobacillus*, такие как *L. casei*, *Bacillus*, такие как *B. subtilis*, *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*, и к способам получения микробных клеток, к кормовым добавкам и композициям, включающим микробные клетки, и к применению, включающему введение микробных клеток животным, в том числе, например, для улучшения показателя роста и/или

здоровья.

Содержание всех цитируемых в настоящем изобретении публикаций, патентов и других документов включены в настоящее изобретение для всех целей путем ссылки на них, как если бы содержание каждой отдельной публикации или заявки на патент было специально и индивидуально включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Кроме того, цитирование или указание любой публикации в этой заявке не следует рассматривать как признание того, что такая публикация характеризует предшествующий уровень техники для настоящего изобретения.

Терминология

Если не указано иное, то все используемые в настоящем изобретении научно-технические термины имеют значения, которые являются общепринятыми для любого специалиста в той области, к которой относится это изобретение. В случае противоречий, преимущественную силу будут иметь определения терминов, содержащиеся в настоящем изобретении. Если иное не вытекает из контекста, то термины в форме единственного числа могут включать значения во множественном числе, и термины во множественном числе могут включать значение в единственном числе.

В тех случаях, когда используются заголовки для разделов в описании изобретения, их не следует рассматривать в качестве обязательного ограничения.

Используемые в изобретении и в пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают и формы множественного числа, если из контекста в явном виде не следует иное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере, одно соединение" может включать множество соединений, в том числе и их смеси. Термины "один", "один или более" и "по меньшей мере один", например, могут использоваться в изобретении взаимозаменяемо.

Используемый в изобретении термин "приблизительно", в случае, когда его применяют для определения относящейся к изобретению величины, означает колебание численной величины, которое может происходить, например, в процессе стандартных испытаний и манипуляций, в результате непреднамеренной ошибки при проведении такого испытания и таких манипуляций, в силу различий в изготовлении, источнике или чистоте используемых в изобретении ингредиентов и в силу других подобных причин. Независимо от того, применяется, или не применяется, в изобретении термин "приблизительно", пункты формулы изобретения включают эквиваленты указываемых количеств. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" означает плюс или минус 10% от указанного численного значения.

В любом месте описания настоящего изобретения различные варианты осуществления этого изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует иметь в виду, что описание в формате диапазона используют только с целью удобства и краткости и формат диапазона не должен рассматриваться в качестве жесткого ограничения объема изобретения.

Соответственно, следует иметь в виду, что описание диапазона включает в себя конкретно раскрытые все возможные поддиапазоны, а также индивидуальные численные величины внутри этого диапазона. Например, следует иметь в виду, что описание диапазона, такого как от 1 до 6, включает в себя конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 3, от 2 до 4, от 2 до 5, от 2 до 6, от 3 до 4, от 3 до 5, от 3 до 6, и так далее, а также индивидуальные численные величины внутри этого диапазона, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо вне зависимости от ширины диапазона.

Термины "включает", "включающий", "содержит", "содержащий", "имеющий" и их сопряжения являются взаимозаменяемыми и обозначают "включая, но этим не ограничивая". Следует иметь в виду, что во всех случаях, когда аспекты в настоящем изобретении описаны с использованием формулировки "включающий", аналогичные аспекты также могут быть представлены иначе терминами "состоящий из" и/или "состоящий в основном из".

Термин "состоящий из" означает "включающий, но этим ограничивая"

Термин "состоящий в основном из" обозначает указанный материал композиции или указанные стадии способа, и те дополнительные материалы или стадии, которые по существу не влияют на основные характеристики материала или способа.

Термин "и/или" в случаях, когда он используется в изобретении, предназначен для описания каждой из двух указанных характеристик или компонентов вместе с другой указанной характеристикой или другим указанным компонентом или без другой указанной характеристики или другого указанного компонента. Поэтому, предполагается, что термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно), и "В" (отдельно). Аналогичным образом, предполагается, что термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С", включает в себя каждое из следующих выражений: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Используемые в изобретении термины "культура клеток", "культивировать" и "культивирование" обозначают инкубацию клеток в *in vitro* условиях, которые создают возможность для роста или деления клеток, или которые способствуют поддержанию жизнеспособности клеток. Термин "культура клеток" может также использоваться в изобретении для обозначения клеток, подвергаемых инкубации в *in vitro*

условиях (например, клеток, инкубируемых в жидкой питательной среде).

Используемый в изобретении термин "пробиотик" относится к одному или более живым микроорганизмам (бактериям и/или дрожжевым грибам), которые могут включать, или могут не включать, другие ингредиенты, и которые при введении в соответствующих количествах могут оказывать положительное воздействие на здоровье, пищеварение и/или продуктивность животного или субъекта.

Используемый в изобретении термин "пробиотический продукт" относится к продукту, который содержит один или более живых микроорганизмов (бактерий и/или дрожжевых грибов), и который может включать, или может не включать, другие ингредиенты, и пробиотический продукт может быть введен животному или субъекту в кормовых смесях, пилулях и/или пероральных пастах, и при введении в соответствующих количествах, он может оказывать положительное воздействие на здоровье животного или субъекта.

Используемый в изобретении термин "кормовая добавка" относится к одному или более ингредиентам, продуктам или веществам (например, клеткам), используемым по отдельности или вместе, при кормлении (например, для улучшения качества пищи (например, корма для животных), для улучшения показателей продуктивности и здоровья животных, и/или для повышения перевариваемости корма или материалов в составе корма). Кормовая добавка может представлять собой, например, пробиотик.

Используемые в изобретении термины "питательная среда" и "культуральная среда" относятся к твердой (например, агар), полутвердой (например, агар) или жидкой (например, бульон) композиции, которая содержит компоненты для поддержания роста клеток.

Используемые в изобретении термины "сбор" и "собрание" относятся к собиранию клеток из культуральной среды, например, к собиранию клеток в питательной среде из культуральной среды, к собиранию клеток путем удаления количества питательной среды из клеток (например, путем концентрирования клеток в жидкой культуре или путем отделения клеток от питательной среды), или к прерыванию культивирования клеток. Термины включают собирание или удаление объема жидкости, содержащей клетки, от жидкой культуры, включающей объем, в котором концентрировали клетки.

Используемый в изобретении термин "выделенный" необязательно отражает степень, до которой изолят был очищен, но обозначает выделение или отделение от нативной формы или нативной окружающей среды. Изолят может включать, но этим не ограничивая, выделенный микроорганизм, выделенную биомассу или выделенную культуру клеток.

Используемый в изобретении термин "эффективное количество" относится к количеству, которое позволяет достигать требуемого результата.

Используемые в изобретении термины "терапевтически эффективное количество" или "эффективное с клинической точки зрения количество" относятся к количеству, которое позволяет достигать требуемого терапевтического результата, включая, например, количество компонента, используемого либо отдельно, либо в комбинации с другими компонентами. Терапевтический результат может представлять собой, например, облегчение симптомов, пролонгирование продолжительности жизни, улучшение подвижности и другие подобные терапевтические результаты. Терапевтический результат не обязательно должен представлять собой "выздоровление".

Используемый в изобретении термин "вспомогательное вещество" относится к компоненту или к смеси компонентов, которые используют для придания требуемых характеристик кормовой добавке, корму или композиции, описанным в изобретении. Вспомогательное вещество по настоящему изобретению при его добавлении в фармацевтическую композицию может быть описано как "фармацевтически приемлемое" вспомогательное вещество, то есть подразумевая, что вспомогательное вещество представляет собой соединение, материал, композицию, соль и/или лекарственную форму, которые на основании результатов тщательной медицинской оценки являются пригодными для контакта с тканями животных (то есть, людей и низших животных) без повышенной токсичности, воспаления, аллергической реакции или других проблематичных осложнений в течение требуемого периода контакта в соответствии с целесообразным соотношением между риском и достигаемым положительным результатом.

Термины "лечить" и "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или торможение (облегчение) нежелательного физиологического состояния, заболевания или расстройства, или достижение лечебных или требуемых физиологических результатов (например, клинических, медицинских и/или ветеринарных результатов). Применительно к настоящему изобретению лечебные или требуемые результаты включают, но этим не ограничивая, облегчение или исключение симптомов или признаков, связанных с состоянием, заболеванием или расстройством; уменьшение степени тяжести состояния, заболевания или расстройства; стабилизацию состояния, заболевания или расстройства (то есть, когда состояние, заболевание или расстройство не усугубляется); отсрочку начала или прогрессирования состояния, заболевания или расстройства; улучшение состояния, заболевания или расстройства; ремиссию (либо частичную, либо полную, и либо обнаруживаемую, либо необнаруживаемую) состояния, заболевания или расстройства; или стимуляцию или улучшение состояния, заболевания или расстройства. Лечение включает достижение физиологически значимой ответной реакции без чрезмерных побочных эффектов. Лечение также включает пролонгирование продолжительности жизни по сравнению с прогнозируемой продолжи-

тельностью жизни при отсутствии лечения.

Используемые в изобретении термины "предотвращать" и "предотвращающий" относятся к частичной или полной отсрочке начала возникновения инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния; к частичной или полной отсрочке начала возникновения одного или более признаков, симптомов, характерных особенностей или проявлений (например, клинических или физиологических признаков, симптомов, особенностей или проявлений) конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния; к частичной или полной отсрочке прогрессирования инфекции, конкретного заболевания, расстройства и/или состояния; и/или к снижению риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, расстройством и/или состоянием.

Используемый в изобретении термин "выход" относится к количеству живых или жизнеспособных клеток, включающему количество в конкретном объеме (например, колониеобразующие единицы в миллилитре ("КОЕ/мл")) или в конкретной массе (например, КОЕ в грамме ("КОЕ/г")).

Используемый в изобретении термин "жизнеспособный" относится к живому организму или органам (например, к микробной клетке, которая является живой, или к микробным клеткам, которые являются живыми). "Жизнеспособность" означает способность к жизни, в частности, в конкретных условиях.

Используемые в изобретении термины, "очищать", "очищенный" и "очистка" означают делать материал практически чистым или очищать его от нежелательных компонентов, загрязнения, примеси или дефекта.

Термины "изобретение" и "раскрытие" могут применяться взаимозаменяемо при описании или использовании, например, в фразах "настоящее изобретение" или "настоящее раскрытие".

Термины "животное" или "субъект" относятся к любому организму, принадлежащему к царству животных, и который включает, без ограничения, водных животных и земных животных, таких как рыбы; промысловая рыба; декоративная рыба; личинка рыбы; двусторчатые моллюски; моллюски; ракообразные; устрицы; креветки; личинки креветок; артемия; коловратки; солонowodная креветка; фильтраторы; амфибии; пресмыкающиеся; млекопитающие; люди; не принадлежащие к человеческому роду животные; домашние животные; сельскохозяйственные животные; животные в зоопарках; животные для спортивных состязаний; племенной скот; животные для скачек; животные для представлений; негибридные животные; редкие или вымирающие животные; животные-компаньоны; комнатные и домашние животные, такие как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши или лошади; приматы, такие как обезьяны (например, капуцин, макак-резус, африканская зеленая мартышка, мартышка-гусар, яванский макак и мартышки), высшие обезьяны, орангутанги, бабуины, гиббоны и шимпанзе; представители семейства собачьих, такие как собаки и волки; представители семейства кошачьих, такие как кошки, львы и тигры; непарнокопытные, такие как лошади, пони, ослы, мулы и зебры; мясомолочные животные, такие как коровы, буйволы, крупный рогатый скот, свиньи, домашняя птица и овцы; копытные, такие как олень и жирафы; пернатые (то есть, птицы); домашние птицы, такие как курицы, гуси, утки, перепелки, индейки, голуби, казуарообразные, страусовые и любая другая птица, используемая в качестве пищи или сельскохозяйственного животного, в том числе бройлеры, племенные бройлеры и курицы-несушки; грызуны, такие как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; и другие подобные животные. Корм для животных включает, но этим не ограничивая, корм для рыб, корм для домашних животных, в том числе корм для комнатных животных, корм для животных в зоопарках, корм для рабочих животных, корм для скота и их комбинации. Корм включает корм для животных, и еду для человека.

Очевидно, что конкретные признаки изобретения, которые для ясности описаны в отдельных вариантах осуществления, могут быть также предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в одном варианте осуществления, могут быть также представлены отдельно или в любой подходящей субкомбинации или, когда это возможно, в любом другом описанном варианте осуществления изобретения. Конкретные признаки, описанные в различных вариантах осуществления, не следует рассматривать в качестве основных признаков этих вариантов осуществления, если только этот вариант осуществления не может быть осуществлен без этих элементов.

Несмотря на то, что способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в изобретении, могут быть применены на практике или при испытании настоящего изобретения, тем не менее, подходящие способы и материалы описаны ниже. Материалы, способы и примеры являются только иллюстрациями, и они не являются ограничениями для настоящего изобретения. Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из подробного описания изобретения и пунктов формулы изобретения.

Megasphaera elsdenii:

В описанном изобретении могут быть использованы клетки *Megasphaera elsdenii* любого штамма или любой комбинации штаммов.

Штамм или штаммы *M. elsdenii* могут быть выбраны из коллекции чистых культур (например, Американской коллекции типовых культур ("ATCC®"), Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских микроорганизмов ("NCIMB"), Национальной коллекции типовых культур ("NCTC"),

Коллекции культур Американской исследовательской службы ("ARC") (то есть, "NRRL"), Коллекции культур Национального института здоровья животных (NIAH)), или могут представлять собой штамм, который был выделен из природного источника (например, из желудочно-кишечного тракта жвачного животного).

Примеры штаммов *M. elsdenii*, которые могут быть выбраны из коллекции культур, включают, но этим не ограничивая, штаммы, указанные по их депозитарным номерам в табл. 1. Кроме того, также указаны альтернативные обозначения депозитарных номеров.

Таблица 1. Примеры штаммов *M. elsdenii* и источник каждого штамма

Депозитарный номер	Альтернативные обозначения	Источник штамма
ATCC® 25940	NCIMB 8927; BE2-2083	Рубец овцы
ATCC® 17752	B159; NCIMB 702409; NCD02409	N/A
ATCC® 17753	T81; NCIMB 702410; NCD02410	N/A
NCIMB 702261	A17-2; A12-2; NCD02261	Экскременты взрослого человека
NCIMB 702262	S17-3; NCD02262	Экскременты поросенка
NCIMB 702264	LC1	Нет сведений
NCIMB 702331	LC1; NCD02263; NCD02264; NCD02331;	Нет сведений
NCIMB 41125		Рубец молочной коровы
NCIMB 41787		Рубец молочной коровы
NCIMB 41788		Рубец молочной коровы
NRRL 18624		Рубец жвачного животного
NIAH 1102		Нет сведений

В некоторых вариантах осуществления, клетки *M. elsdenii* относятся к штамму, имеющему депозитарный номер, выбранный из группы, состоящей из ATCC® 25940, ATCC® 17752, ATCC® 17753, NCIMB 702261, NCIMB 702262, NCIMB 702264, NCIMB 702331, NCIMB 702409, NCIMB 702410, NCIMB 41125, NCIMB 41787, NCIMB 41788, NRRL 18 624, NIAH 1102 и их комбинаций, включая любое из альтернативных обозначений в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму, выделенному из жвачного животного (например, коровы). Смотрите, например, патентный документ U.S. Patent № 7550139.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму, выделенному из нежвачного животного (например, человека).

В некоторых вариантах осуществления, клетки *M. elsdenii* относятся к штамму, выбранному для утилизации лактата (например, к штамму, который утилизирует лактат в присутствии сахаров), обладающему резистентностью к ионофорным антибиотикам, относительно высокой скоростью роста, способностью продуцировать преимущественно ацетат, способностью к пролиферации при значениях pH ниже 5,0 и до 4,5, способностью продуцировать летучие жирные кислоты (VFAs), обладающему фитазной активностью и их комбинацией. Смотрите, например, патентный документ U.S. Patent № 7550139.

В некоторых вариантах осуществления выбранный для утилизации лактата штамм утилизирует лактат в качестве предпочтительного источника углерода в присутствии растворимого углевода (например, глюкозы и/или мальтозы). Утилизация лактата может быть определена, например, по результатам роста в среде, содержащей лактат и не содержащей растворимых углеводов в сравнении с аналогичной средой, дополненной растворимыми углеводами.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму с высокой скоростью роста по сравнению с другими штаммами. Скорости роста различных штаммов могут быть определены, например, путем культивирования клеток в жидкой среде и мониторинга увеличения величины оптической плотности в течение времени.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму, способному продуцировать VFAs, которые могут быть определены, например, методом газовой хроматографии. В некото-

рых вариантах осуществления VFA представляет собой жирную кислоту с 6 углеродными атомами, которая способна ингибировать рост сальмонеллы и/или кампилобактера. В некоторых вариантах осуществления VFA представляет собой капроновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, сальмонелла представляет собой *Salmonella enterica* и/или *Salmonella bongori*. В некоторых вариантах осуществления серологическим типом сальмонеллы является *Salmonella Typhimurium* и/или *Enteritidis*. В некоторых вариантах осуществления кампилобактер представляет собой *Campylobacter jejuni* или *Campylobacter coli*.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму с фитазной активностью.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. Этот штамм *Megasphaera elsdenii* обладает высокой удельной скоростью роста (0,94 генераций/час), способен к росту в диапазоне значений pH от 4,5 до 6,5 или более, использует D- и L-лактат в качестве его предпочтительного субстрата, а также обладает способностью утилизировать глюкозу и другие углеводы, и резистентен к ионофорам.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41787. В некоторых вариантах осуществления, клетки *M. elsdenii* относятся к штамму *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41788.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* относятся к штамму *Megasphaera elsdenii* ATCC® 25940.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* получают из штамма, выбранного из коллекции чистых культур или выделенного из природного источника. Клетки, которые "получают" из штамма, могут представлять собой природное или искусственное производное, такое как, например, субпопуляция изолята, мутант, вариант или рекомбинантный штамм.

Приготовление культуры, включающей анаэробные клетки, аэробные клетки и/или клетки дрожжевых грибов *M. elsdenii* представляет собой анаэробную бактерию, которая должна культивироваться в строго анаэробных условиях для достижения максимального выхода и жизнеспособности.

В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *M. elsdenii* и питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления культура включает один или более штаммов клетки *M. elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления культура включает только один штамм клетки *M. elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления культура состоит из одного или более штаммов клетки *M. elsdenii* (то есть, клетки в культуре состоят из клеток *M. elsdenii*, например, одного или более штаммов клеток *M. elsdenii*). В некоторых вариантах осуществления культура состоит из только одного штамма клеток *M. elsdenii*.

В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *Megasphaera* и питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления культура включает анаэробные бактериальные клетки и питательную среду. В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis subsp. lactis*, клетки *Pediosoccus*, такие как *P. acidilactici*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. Casei*, и питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления культура включает аэробные бактериальные клетки и питательную среду. В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *Bacillus*, такие как *B. Subtilis*, и питательную среду.

В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки дрожжевых грибов и питательную среду. В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*.

Для инокуляции, роста и сбора микробных клеток могут быть использованы различные режимы ферментации, включающие непрерывную ферментацию (то есть, непрерывное культивирование) или периодическую ферментацию (то есть, периодическое культивирование). См., например, патентный документ U.S. Patent № 7550139.

Питательная среда для микробных клеток может быть твердой, полутвердой или жидкой. Среда может содержать питательные вещества, которые поставляют важные элементы и специфические факторы, обеспечивающие возможность роста. Хорошо известен целый ряд микробиологических сред и их вариаций. Среды могут быть добавлены в культуру в любой момент, в том числе в начале культивирования, в процессе культивирования или периодически/непрерывно.

Примеры питательных сред включают, но этим не ограничивая: (1) полуопределенную среду, которая содержит пептон, 3 г/л; дрожжевые грибы, 3 г/л; раствор витамина, 2 мл/л; раствор минеральной добавки, 25 мл/л; индигокармин (0,5%), 1 г/л; 12,5% L-цистеин, 2 г/л; 12,5% сульфид натрия, 2 г/л; и дополненная либо Na-лактатом (полуопределенным лактатом, SDL), глюкозой (полуопределенной глюкозой, SDG), либо мальтозой (полуопределенной мальтозой, SDM); (2) модифицированную усиленную кистрициальную среду на основе агара/бульона (предварительно восстановленную), которая содержит пептон, 10 г/л; мясной экстракт, 10 г/л; экстракт дрожжевых грибов, 3 г/л; декстрозу 5 г/л; NaCl, 5 г/л;

растворимый крахмал, 1 г/л; L-цистеин HCl, 0,5 г/л; ацетат натрия, 3 г/л и diazoresorcin (0,025%), 4 мл/л; (3) триптиказо-соевый агар/бульон с дефибринированной кровью овцы; (4) полуопределенную несодержащую рубцовой жидкости среду, которая содержит Na-лактат (70%), 10 г/л; пептон, 2 г/л; KH_2PO_4 1 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 г/л; витамины (пиридоксолгидрохлорид, 4 мг/л; пиридоксамин, 4 мг/л; рибофлабин, 4 мг/л; тиамина хлорид, 4 мг/л; никотинамид, 4 мг/л; Ca-D-пантотенат, 4 мг/л; 4-аминобензойная кислота, 0,2 мг/л, биотин, 0,2 мг/л, фолиевая кислота, 0,1 мг/л и цианокобаламин, 0,02 мг/л); $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,25 г/л; цистеин, 0,25 г/л; противовспениватель, 0,07 мл/л и мненсин, 10 мг/л; и которую приготавливают путем добавления Na-лактата и раствора минеральной добавки в резервуар в форме бутылки и автоклавирования в течение 60 мин; растворения пептона в 300 мл дистиллированной воды H_2O и отдельного автоклавирования; заблаговременной стерилизации посредством фильтрации раствора витамина и двух восстанавливающих реагентов; затем автоклавирования, газирования резервуара в форме бутылки анаэробным газом в течение ночи; отдельного добавления других составляющих компонентов после охлаждения; и корректировки значения pH до требуемой величины с помощью 5N HCl; и (5) лактатную среду инкубированной рубцовой жидкости ("IRFL"), которая содержит 400 мл инкубированной осветленной рубцовой жидкости из овцы, которую кормили люцерной, 371 мл дистиллированной воды, 2 г пептона, 15 г агара, 100 мл 10% (в отношении веса к объему) раствора D, L-лактата натрия, 100 мл раствора 0,04% (в отношении веса к объему) бромкрезолового пурпурного, и 25 мл раствора минеральной добавки, содержащей 40 г/л KH_2PO_4 ; 120 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 2,4 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, где молочную кислоту (90% в отношении веса к объему) используют для корректировки значения pH до 5,5 перед автоклавированием при 121°C в течение 25 мин, затем охлаждают в водяной бане с температурой 50°C при газировании смесью анаэробного газа, затем добавляют два миллилитра каждого из $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (12,5% в отношении веса к объему) и цистеина-HCl-H₂O (12,5% в отношении веса к объему).

В некоторых вариантах осуществления культура включает питательную среду, включающую по меньшей мере один источник углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один источник углерода выбирают из группы, состоящей из казеина, крахмала (например, желатинизированного крахмала и/или растворимого крахмала), лактата (то есть, молочной кислоты), декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстрактов дрожжевых грибов и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления, культура включает питательную среду, включающую по меньшей мере два источника углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два источника углерода выбирают из группы, состоящей из казеина, крахмала (например, желатинизированного крахмала и/или растворимого крахмала), лактата (то есть, молочной кислоты), декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два источника углерода состоят из приблизительно 1-99% первого источника углерода (например, любого источника углерода, описанного в изобретении) и приблизительно 1-99% второго источника углерода (например, любого источника углерода, описанного в изобретении, который отличается от первого источника углерода), где 100% по меньшей мере двух источников углерода состоят из первого источника углерода и второго источника углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два источника углерода состоят из приблизительно 50-60% первого источника углерода и приблизительно 40-50% второго источника углерода, приблизительно 50-70% первого источника углерода и приблизительно 30-50% второго источника углерода, приблизительно 50-80% первого источника углерода и приблизительно 20-50% второго источника углерода, или приблизительно 50-90% первого источника углерода и приблизительно 10-50% второго источника углерода. В других вариантах осуществления по меньшей мере два источника углерода состоят из приблизительно 65-75% первого источника углерода и приблизительно 25-35% второго источника углерода. В некоторых вариантах осуществления первый источник углерода представляет собой лактат.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* выращивают при температуре от приблизительно 39 до приблизительно 40°C, приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39 или приблизительно 40°C.

В некоторых вариантах осуществления микробные клетки выращивают при температуре от приблизительно 15 до приблизительно 45°C, приблизительно от 20 до 40°C, приблизительно от 25 до 35°C, от 30 до 39°C. В некоторых вариантах осуществления микробные клетки выращивают при температуре приблизительно 30°C, приблизительно 31°C, приблизительно 32°C, приблизительно 33°C, приблизительно 34°C, приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39 или приблизительно 40°C.

В некоторых вариантах осуществления микробные клетки охлаждают до температуры от приблизительно 18 до приблизительно 25°C для хранения.

В некоторых вариантах осуществления величина pH культуры, включающей клетки *M. elsdenii* (например, во время культивирования и/или в момент сбора) составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,6 до приблизительно 6,9, от приблизительно 4,7 до приблизительно 6,8, от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,7, от приблизительно 4,9 до приблизительно 6,6, от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,5, от приблизительно 5,1 до приблизительно 6,9, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,8, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,7, от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,6, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,1 до приблизительно 6,4, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,3, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,2, от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,1, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,1, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,2, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,3, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,4, от приблизительно 5,1 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,5 или от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,5.

В некоторых вариантах осуществления величина pH культуры, включающей клетки *M. elsdenii* (например, во время культивирования и/или в момент сбора) составляет от приблизительно 4,0 до приблизительно 9,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 8,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5, от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0.

Для культивирования микробных клеток могут быть использованы ферментеры различных размеров и конструкций, которые поддерживают анаэробные условия. Ферментер может быть способен, например, ферментировать объемы культур, достаточных для промышленного производства клеток *M. elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления объем культуры составляет приблизительно 2 л, приблизительно 10 л, приблизительно 50 л, приблизительно 100 л, приблизительно 150 л, приблизительно 200 л, приблизительно 250 л, приблизительно 300 л, приблизительно 350 л, приблизительно 400 л, приблизительно 450 л, приблизительно 500 л, приблизительно 600 л, приблизительно 800 л, приблизительно 1000 л, приблизительно 1200 л, приблизительно 1500 л, приблизительно 1800 л, приблизительно 2000 л, приблизительно 2200 л, приблизительно 2500 л, приблизительно 2750 л, приблизительно 3000 л, приблизительно 4000 л, приблизительно 5000 л, приблизительно 6000 л, приблизительно 7000 л, приблизительно 8000 л, приблизительно 9000 л, приблизительно 10000 л, по меньшей мере приблизительно 20000 л, по меньшей мере приблизительно 50000 л или по меньшей мере приблизительно 75000 л. В некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет от приблизительно 2 до приблизительно 75000 л, от приблизительно 250 до приблизительно 750 л, от приблизительно 300 до приблизительно 800 л, от приблизительно 350 до приблизительно 850 л, от приблизительно 400 до приблизительно 900 л, от приблизительно 450 до приблизительно 950 л, от приблизительно 500 до приблизительно 1000 л, от приблизительно 750 до приблизительно 1250 л, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 л, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000 л, от приблизительно 4000 до приблизительно 8000 л, от приблизительно 5000 до приблизительно 10000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 75000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 50000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 25000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 20000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 15000 л, от приблизительно 50 до приблизительно 10000 л, от приблизительно 100 до приблизительно 10000 л, от приблизительно 100 до приблизительно 5000 л, от приблизительно 100 до приблизительно 4000 л, от приблизительно 100 до приблизительно 3000 л, от приблизительно 100 до приблизительно 2900 л, от приблизительно 100 до приблизительно 2850 л, от приблизительно 100 до приблизительно 2800 л, от приблизительно 100 до приблизительно 2750 л, приблизительно 2 л, приблизительно 10 л, приблизительно 50 л, приблизительно 100 л, приблизительно 200 л, приблизительно 500 л, приблизительно 1000 л, приблизительно 1500 л, приблизительно 10000 л, приблизительно 20000 л, приблизительно 50000 или приблизительно 75000 л.

В некоторых вариантах осуществления культура, включающая клетки *M. Elsdenii*, также включает другой микроорганизм (то есть, микробную клетку, которая не является клеткой *M. elsdenii*). В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *M. elsdenii* и другой микроорганизм, который представляет собой облигатный анаэроб. В некоторых вариантах осуществления культура включает клетки *M. elsdenii* и другой микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Candida*, *Clostridium*, *Pediococcus*, *Aspergillus* и *Saccharomyces*.

Лиофилизированные аэробные, анаэробные клетки и клетки дрожжевых грибов

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *M. elsdenii*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *M. Elsdenii*, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Megasphaera*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Megasphaera*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Megasphaera*, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных анаэробных бактериальных клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Bifidobacterium*, таких как клетки *B. breve*, *Lactobacillus*, таких как *L. plantarum*, клеток *Bifidobacterium*, таких как *B. animalis subsp. lactis*, клеток *Pediococcus*, таких как *P. acidilactici*, клеток *Lactobacillus*, таких как *L. casei*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным анаэробным бактериальным клеткам.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Bifidobacterium*, таким как *B. breve*, клеткам *Lactobacillus*, таким как *L. plantarum*, клеткам *Bifidobacterium*, таким как *B. animalis subsp. lactis*, клеткам *Pediococcus*, таким как *P. acidilactici*, клеткам *Lactobacillus*, таким как *L. casei*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным анаэробным бактериям, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Bifidobacterium*, таким как *B. breve*, клеткам *Lactobacillus*, таким как *L. plantarum*, клеткам *Bifidobacterium*, таким как *B. animalis subsp. lactis*, клеткам *Pediococcus*, таким как *P. acidilactici*, клеткам *Lactobacillus*, таким как *L. Casei*, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных аэробных бактериальных клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Bacillus*, таких как *B. subtilis*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным аэробным бактериальным клеткам.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Bacillus*, таким как *B. subtilis*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным аэробным бактериальным клеткам, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам *Bacillus*, таким как *B. subtilis*, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток дрожжевых грибов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированных клеток *Saccharomyces*, таких как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам дрожжевых грибов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным сахаромицетам, таким как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам дрожжевых грибов, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным клеткам сахаромицетов, таких как *S. boulardii* и *S. Cerevisiae*, полученным раскрытым в изобретении способом.

В другом аспекте способ получения лиофилизированных клеток *M. elsdenii* включает приготовление культуры, включающей клетки *M. elsdenii*, и питательной среды; сбор клеток; замораживание клеток; и лиофилизацию клеток, в результате чего получают лиофилизированные клетки *M. elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления способ применяют для того, чтобы получить культуру, затем собрать клетки (то есть, собрать культивируемые клетки), затем заморозить клетки (то есть, заморозить собранные клетки) и затем лиофилировать клетки (то есть, лиофилировать замороженные клетки).

В некоторых вариантах осуществления способ применяют в анаэробных условиях. В некоторых вариантах осуществления способ включает приготовление культуры, сбор клеток, замораживание клеток, лиофилизацию клеток или их комбинации в анаэробных условиях.

Способ может включать любой из описанных в изобретении способов приготовления культуры. Культура по способу может также включать любые из описанных в изобретении свойств культуры.

В некоторых вариантах осуществления клетки в культуре включают клетки *M. elsdenii*. В некото-

рых вариантах осуществления клетки в культуре состоят из клеток *M. elsdenii*.

В некоторых вариантах осуществления питательная среда включает по меньшей мере два источника углерода выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата (то есть, молочной кислоты), декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, тростникового сахара, ксилитозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления способ включает сбор клеток не позднее чем через 12 ч после того, как закончилась фаза экспоненциального роста культуры клеток, и до того, как началась фаза стационарного роста культуры клеток. Культура может быть охлаждена до комнатной температуры для остановки роста на момент сбора.

В некоторых вариантах осуществления культура включает жидкость и способ включает сбор клеток *M. elsdenii* (например, концентрированных клеток *M. elsdenii*) с частью жидкости. В некоторых вариантах осуществления способ включает сбор клеток с частью жидкости, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 40%, от приблизительно 1 до приблизительно 35%, от приблизительно 1 до приблизительно 30%, от приблизительно 1 до приблизительно 25%, от приблизительно 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 1 до приблизительно 15%, от приблизительно 1 до приблизительно 10%, от приблизительно 1 до приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%. В некоторых вариантах осуществления способ включает сбор клеток с частью жидкости, составляющей менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 35%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 25%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 9%, менее чем приблизительно 8%, менее чем приблизительно 7%, менее чем приблизительно 6%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%.

В некоторых вариантах осуществления культура включает жидкость и способ включает сбор клеток *M. elsdenii* (например, концентрированных клеток *M. elsdenii*) путем удаления части жидкости. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток включает удаление от приблизительно 50 до приблизительно 100% жидкости, от приблизительно 55 до приблизительно 100%, от приблизительно 60 до приблизительно 100%, от приблизительно 65 до приблизительно 100%, от приблизительно 70 до приблизительно 100%, от приблизительно 75 до приблизительно 100%, от приблизительно 80 до приблизительно 100%, от приблизительно 85 до приблизительно 100%, от приблизительно 90 до приблизительно 100% или от приблизительно 95 до приблизительно 100% жидкости.

В некоторых вариантах осуществления, сбор клеток включает удаление по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100% жидкости.

В некоторых вариантах осуществления способ включает сбор клеток *M. elsdenii* путем концентрирования клеток. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток включает концентрирование клеток с помощью по меньшей мере одного метода, выбранного из группы, состоящей из центрифугирования, фильтрации, диализа, обратного осмоса и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления фильтрация включает фильтрация через глину. В некоторых вариантах осуществления фильтрация включает тангенциальную поточную фильтрацию, называемую также фильтрацией в перекрестном потоке.

В некоторых вариантах осуществления величина pH культуры, включающей клетки *M. Elsdenii*, на момент сбора клеток составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,6 до приблизительно 6,9, от приблизительно 4,7 до приблизительно 6,8, от приблизительно 4,8 до приблизительно 6,7, от приблизительно 4,9 до приблизительно 6,6, от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,5, от приблизительно 5,1 до приблизительно 6,9, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,8, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,7, от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,6, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,1 до приблизительно 6,4, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,3, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,2, от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,1, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,1, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,2, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,3, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,4, от при-

близительно 5,1 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,3 до приблизительно 6,5 или от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,5.

В некоторых вариантах осуществления способ включает инокуляцию питательной среды в ферментере с помощью инокулята, включающего клетки *M. Elsdennii*, для приготовления культуры, и инкубацию культуры при температуре приблизительно 39°C до тех пор, пока величина pH культуры не достигнет приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления инокулят, включающий клетки *M. Elsdennii*, представляет собой культуру клеток *M. elsdennii* или ее часть, выращенную в колбе. В некоторых вариантах осуществления способ включает инокуляцию питательной среды в ферментере при отношении инокулята к среде от 1/50 до 1/4000. В некоторых вариантах осуществления отношение инокулята к среде составляет 1/100.

В некоторых вариантах осуществления культура дополнительно включает по меньшей мере один криопротектор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один криопротектор выбирают из группы, состоящей из фруктозы, глюкозы, сахарозы, порошкового молока, детской молочной смеси, обезжиренного молока, трегалозы, мальтодекстрина, бетаина и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один криопротектор присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 1 до приблизительно 50% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 1 до приблизительно 40% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 1 до приблизительно 30% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 1 до приблизительно 20% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 1 до приблизительно 10% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 1 до приблизительно 5% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 10 до приблизительно 20% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 15 до приблизительно 25% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 20 до приблизительно 30% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 30 до приблизительно 40% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 40 до приблизительно 50% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 60 до приблизительно 70% (в отношении веса к объему) культуры, от приблизительно 70 до приблизительно 80% (в отношении веса к объему) культуры. В некоторых вариантах осуществления криопротектор вводят путем добавления порошка криопротектора непосредственно к концентрированным клеткам *M. elsdennii*. В некоторых вариантах осуществления криопротектор вводят путем добавления раствора криопротектора непосредственно к концентрированным клеткам *M. elsdennii* при отношении 1/1, при отношении 1/5 или при отношении 1/10.

В некоторых вариантах осуществления замораживание клеток включает помещение клеток в морозильник или контактирование клеток с сухим льдом, жидким азотом или их комбинацией. Замораживание клеток включает замораживание клеток, когда они находятся внутри контейнера. Контактное замораживание клеток включает контактирование контейнера, включающего клетки, со средой для замораживания клеток. Среда для замораживания клеток включает, но этим не ограничивая, морозильник, баню с уксусом и сухим льдом, жидкий азот или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре от приблизительно -20°C до приблизительно -210°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре от приблизительно -20°C до приблизительно -80°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно 210°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре от приблизительно -20°C до приблизительно -196°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -196°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре приблизительно -20°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре приблизительно -80°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток при температуре приблизительно -196°C. В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток путем контактирования клеток с жидким азотом.

В некоторых вариантах осуществления способ включает замораживание клеток в анаэробных условиях.

В некоторых вариантах осуществления замораживание дает замороженные осадки, включающие клетки. Например, замораживание может быть достигнуто путем использования морозильника сверхбыстрого замораживания (например, Model 250-S01 Crygran, IFQ Inc.).

В некоторых вариантах осуществления диаметр замороженных осадков составляет от приблизительно 0,0254 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 10,16 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 12,7 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 15,24 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 17,78 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 20,32 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 22,86 до приблизительно 25,4 мм, от приблизительно 0,0254 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно

22,86 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 10,16 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 12,7 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 15,24 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 17,78 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 20,32 до приблизительно 22,86 мм, от приблизительно 0,0254 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 10,16 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 12,7 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 15,24 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 17,78 до приблизительно 20,32 мм, от приблизительно 0,0254 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 10,16 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 12,7 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 15,24 до приблизительно 17,78 мм, от приблизительно 0,0254 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 10,16 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 12,7 до приблизительно 15,24 мм, от приблизительно 0,0254 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 0,254 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 0,05 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 2,54 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 2,545 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 5,08 до приблизительно 12,7 мм, от приблизительно 7,62 до приблизительно 12,7 мм, или от приблизительно 10,16 до приблизительно 12,7 мм.

Замороженные клетки *M. elsdonii* могут храниться замороженными (например, ниже 0°C) перед лиофилизацией или могут быть немедленно подвергнуты лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки *M. elsdonii* хранят при температуре ниже приблизительно 0°C, ниже приблизительно -10°C, ниже приблизительно -20°C, ниже приблизительно -50°C, ниже приблизительно -80°C, или ниже приблизительно -196°C. В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки *M. elsdonii* хранят при температуре приблизительно -20°C, приблизительно -30°C, приблизительно -40°C, приблизительно -50°C, приблизительно -60°C, приблизительно -70°C, приблизительно -80°C, приблизительно -90°C, приблизительно -100°C, приблизительно -150°C, приблизительно -196°C или приблизительно -210°C.

В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки *M. elsdonii* лиофилизируют. В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки *M. elsdonii* являются лиофилизированными. Лиофилизация включает, например, удаление жидкости из замороженных клеток.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизация клеток *M. elsdonii* включает помещение замороженных клеток в лиофильную сушилку. В некоторых вариантах осуществления лиофилизация включает подвергание замороженных клеток воздействию пониженного давления и постепенный подогрев клеток до комнатной температуры.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лиофилизацию клеток в анаэробных условиях.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные клетки *M. elsdonii* получают в промышленном масштабе.

В некоторых вариантах осуществления раскрытым в изобретении способом получают приблизительно от 1×10^3 до 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdonii*. В некоторых вариантах осуществления приблизительно от 1×10^3 до 1×10^{12} КОЕ/г клеток *M. elsdonii* являются жизнеспособными после лиофилизации.

В одном аспекте способ получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdonii* по настоящему изобретению включает: (а) приготовление культуры в анаэробных условиях, включающей клетки *M. elsdonii*, и питательной среды, включающей по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата (то есть, молочной кислоты), декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, (b) сбор клеток в анаэробных условиях, (c) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdonii*.

В другом аспекте способ получения лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdonii* по настоящему изобретению включает: (а) приготовление культуры, включающей клетки *M. elsdonii*, и питательной среды, (b) сбор клеток в анаэробных условиях не позднее чем через 12 часов после того, как закончилась фаза экспоненциального роста культуры клеток, и до того, как началась фаза стационарного роста культуры клеток, (c) замораживание клеток и (d) лиофилизацию клеток, в результате чего получают лиофилизированные клетки *M. elsdonii*.

тельно 1×10^3 КОЕ/г до приблизительно 1×10^5 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^4 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^5 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^6 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^7 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^8 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^9 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^{10} КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^3 КОЕ/г до приблизительно 1×10^5 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^4 КОЕ/г до приблизительно 1×10^6 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^5 КОЕ/г до приблизительно 1×10^7 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^6 КОЕ/г до приблизительно 1×10^8 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^7 КОЕ/г до приблизительно 1×10^9 КОЕ/г, от приблизительно 1×10^8 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{10} КОЕ/г, от приблизительно 1×10^9 КОЕ/г до приблизительно 1×10^{11} КОЕ/г, или от приблизительно 1×10^{10} КОЕ/г до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г лиофилизированных клеток *M. elsdenii* являются жизнеспособными после хранения при температуре приблизительно 25°C в течение по меньшей мере приблизительно 14 дней, по меньшей мере приблизительно 1 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 8 месяцев, по меньшей мере приблизительно 10 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев или по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

Кормовые добавки, композиции и наборы

В одном аспекте, кормовая добавка включает описанные в изобретении клетки *M. elsdenii*.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает описанные в изобретении лиофилизированные клетки *M. elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *M. Elsdenii*, полученные раскрытым в изобретении способом.

В одном аспекте кормовая добавка включает описанные в изобретении клетки *Megasphaera*.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает описанные в изобретении лиофилизированные клетки *Megasphaera*. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Megasphaera*, полученные раскрытым в изобретении способом.

В одном аспекте кормовая добавка включает описанные в изобретении анаэробные бактериальные клетки. В другом аспекте, кормовая добавка включает клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis subsp. lactis*, клетки *Pedococcus*, такие как *P. acidilactici*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. casei*.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает описанные в изобретении лиофилизированные анаэробные бактериальные клетки. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные анаэробные бактериальные клетки, полученные раскрытым в изобретении способом.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis subsp. lactis*, клетки *Pedococcus*, такие как *P. acidilactici*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. casei*. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, клетки *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis subsp. lactis*, клетки *Pedococcus*, такие как *P. acidilactici*, клетки *Lactobacillus*, такие как *L. Casei*, полученные раскрытым в изобретении способом.

В одном аспекте кормовая добавка включает описанные в изобретении аэробные бактериальные клетки. В другом аспекте, кормовая добавка включает клетки *Bacillus*, такие как *B. subtilis*.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает описанные в изобретении лиофилизированные аэробные бактериальные клетки. В некоторых вариантах осуществления, кормовая добавка включает лиофилизированные аэробные бактериальные клетки, полученные раскрытым в изобретении способом.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Bacillus*, такие как *B. subtilis*. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Bacillus*, такие как *B. Subtilis*, полученные раскрытым в изобретении способом.

В одном аспекте кормовая добавка включает описанные в изобретении клетки дрожжевых грибов. В другом аспекте кормовая добавка включает клетки *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает описанные в изобретении лиофилизированные клетки дрожжевых грибов. В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки дрожжевых грибов, полученные раскрытым в изобретении способом.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*. В некоторых вариантах осуществления, кормовая добавка включает лиофилизированные клетки *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. Cerevisiae*, полученные раскрытым в изобретении способом.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка является твердым веществом (то есть, "твердой кормовой добавкой") или жидкостью (то есть, "жидкой кормовой добавкой"). В некоторых ва-

риантах осуществления кормовая добавка полутвердым веществом или гелем (то есть, "полутвердой или гелеобразной кормовой добавкой"). Гелеобразная кормовая добавка может содержать поглотитель кислорода (например, аскорбиновую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления твердая кормовая добавка представляет собой порошок (например, сыпучий порошок), гранулы (то есть, гранулят), частицы (то есть, состоящий из частиц), крупинки, брикеты, водорастворимый концентрат, пасту, пилюли, таблетки, dustы, их компонент, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления жидкая кормовая добавка представляет собой раствор (например, водный, органический или водно-органический раствор), суспензию, эмульсию, кисель, спрей, инъекционный препарат, напиток (например, заменитель молока), их компонент, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления гелеобразная кормовая добавка представляет собой органо-гель. В некоторых вариантах осуществления гелеобразная кормовая добавка представляет собой пероральный гель (то есть, гель для перорального введения).

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка служит в качестве подкормки (то есть, для добавления на поверхность корма или для смешения с кормом (например, с кормом для животных)). В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка предназначена для введения в форме жидкости.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении лиофилизированные клетки *M. elsdenii* могут применяться в качестве жидкой кормовой добавки в результате регидратирования, растворения, солюбилизации и/или суспендирования лиофилизированных клеток в жидкости.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает носитель (то есть, один или более носителей).

Примеры подходящих носителей включают, но этим не ограничивая, растительные материалы (то есть, растения полностью или части растений (например, семена, стебли, листья, цветки, и/или, например, корни), в том числе сушеные или подвергнутые обработке растения или части растений), высушенное зерно (например, сушеная барда), люцерну, кукурузную муку, цитрусовую муку, остаточные продукты брожения, измельченные раковины устриц, глинопорошок тонкого помола из аттапульгированной глины, пшеничные отруби, растворимые вещества мелассы, муку крупного помола из стержней кукурузного початка, съедобные растительные вещества, муку поджаренной лущеной сои, корм из размолотой сои, антибиотический мицелий, вермикулит, сою культурную, молочную сыворотку, мальтодекстрин, сахарозу, декстрозу, известняк (карбонат кальция), рисовую шелуху, культуры дрожжевых грибов, сушеный крахмал, алюмосиликат натрия, воду, растворы солей, спирт, кремнийорганическое соединение, воски, вазелин, растительные масла, полиэтиленгликоли, пропиленгликоль, липосомы, сахара, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, поверхностно-активные вещества, кремниевую кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, нефтяные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и другие подобные вещества и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка включает вспомогательное вещество (то есть, одно или более вспомогательных веществ) включающее, но этим не ограничивая, монокристаллическую целлюлозу; лактозу; цитрат натрия; карбонат кальция; двухосновный фосфат кальция и глицин; разрыхлители, такие как крахмал, натрия крахмал гликолят, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты; связующие вещества для грануляции, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметил-целлюлоза (НРМС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС), сахароза, желатин и аравийская камедь; наполнители, такие как мальтодекстрин; осушители, такие как диоксид кремния; поглотители кислорода, такие как аскорбиновая кислота; и/или смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка представляет собой гранулу, включающую: сердцевину, включающую клетки *M. Elsdenii* и/или кормовую добавку, и слой покрытия поверх сердцевины. В некоторых вариантах осуществления слой покрытия представляет собой гидратированный солевой барьер. Солевое покрытие может обеспечивать повышение термотолерантности, улучшение сохранения свойств при хранении и защиты от других компонентов в гранулах, которые в противном случае, могут оказывать негативное воздействие, например, на стабильность клеток *M. Elsdenii*, и/или на кормовую добавку.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные клетки *M. elsdenii* смешивают с сухим препаратом добавок, включающим, но этим не ограничивая, субстраты для выращивания, ферменты, сахара, углеводы, экстракты и ускоряющие рост микроингредиенты. Сахара могут включать, но этим не ограничивая, лактозу, мальтозу, декстрозу, мальтодекстрин, глюкозу, фруктозу, маннозу, тагатозу, сорбозу, раффинозу, амилозу, крахмал и галактозу. Содержание сахаров может изменяться в диапазоне 50-95%, либо для индивидуального сахара, либо для комбинации сахаров. Экстракты могут включать, но этим не ограничивая, дрожжевые грибы или ферментированные остатки дрожжевых грибов в диапазоне 5-50%. Субстраты для выращивания могут включать, но этим не ограничивая, триптиказу, с содержанием в диапазоне 5-25%; лактат натрия, с содержанием в диапазоне 5-30% и Tween 80, с содержанием в диапазоне 1-5%. Углеводы могут включать, но этим не ограничивая, маннит, сорбит, адонит и арабит. Углеводы могут содержаться в диапазоне 5-50% индивидуально или в комбинации. Микроингредиенты

могут включать, но этим не ограничивая, карбонат кальция, с содержанием в диапазоне 0,5-5,0%; хлорид кальция, с содержанием в диапазоне 0,5-5,0%; дикалийфосфат, с содержанием в диапазоне 0,5-5,0%; фосфат кальция, с содержанием в диапазоне 0,5-5,0%; протеинат марганца, с содержанием в диапазоне 0,25-1,00%; и марганец, с содержанием в диапазоне 0,25-1,00%.

В некоторых вариантах осуществления кормовую добавку *M. elsdonii* приготавливают путем смешения (например, с помощью миксера) клеток *M. elsdonii*, в том числе культуры, включающей эти клетки и/или лиофилизированные клетки, с любыми дополнительными компонентами кормовой добавки (например, с носителем и/или вспомогательным веществом). В некоторых вариантах осуществления компоненты смешивают с получением однородной смеси.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка представляет собой кормовую добавку для подкормки животных, включающую описанные в изобретении клетки *M. elsdonii* (например, лиофилизированные клетки) и носитель. В некоторых вариантах осуществления носитель выбирают из группы, состоящей из молочной сыворотки, мальтодекстрина, сахарозы, декстрозы, известняка (то есть, карбоната кальция), рисовой шелухи, культуры дрожжевых грибов, сухого крахмала и алюмосиликата натрия, молока, воды и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления кормовая добавка для животного представляет собой кисель, спрей или добавку заменителя молока, включающие описанные в изобретении клетки *M. elsdonii* (например, лиофилизированные клетки) и водорастворимый носитель. В некоторых вариантах осуществления носитель выбирают из группы, состоящей из молочной сыворотки, мальтодекстрина, сахарозы, декстрозы, сухого крахмала, алюмосиликата натрия, молока, воды и их комбинаций.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту (например, пищевому продукту для животного), включающему клетки *M. elsdonii* (например, описанные в изобретении лиофилизированные клетки, например, лиофилизированные клетки, полученные описанным в изобретении способом) и/или описанную в изобретении кормовую добавку. Пищевой продукт представляет собой любой пищевой продукт для животного (то есть, для не относящихся к человеку животных или для людей) и включает как твердые, так и жидкие композиции. Пищевые продукты включают, но этим не ограничивая, общепринятые пищевые продукты; жидкие продукты, включая воду, молоко, напитки, терапевтические напитки и диетологические напитки; функциональные пищевые продукты; добавки; биологически активные добавки; детские смеси (то есть, для детенышей зверей и детей человека), в том числе смеси для недоношенных детей и детенышей; корма для беременных или кормящих животных; корма для взрослых животных и пожилых животных. В некоторых вариантах осуществления корм включает жидкость (например, напиток, например, воду, молоко или заменитель молока), включающую кормовую добавку.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, включающей описанные в изобретении клетки *M. elsdonii* (например, лиофилизированные клетки) и/или кормовую добавку. В некоторых вариантах осуществления композиция включает лиофилизированные клетки *M. elsdonii* полученные раскрытым в изобретении способом.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении клетки *M. elsdonii* (например, лиофилизированные клетки) и/или кормовая добавка могут быть подвергнуты дополнительной химической или физической модификации или обработке, исходя из предъявляемых требований к композиции, любым известным методом.

Композиция по изобретению может включать одно или более вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество может представлять собой, но этим не ограничивая, щелочное вещество, стабилизатор, антиоксидант, средство для повышения адгезии, разделяющее средство, средство для нанесения покрытия, компонент внешней фазы, компонент для контролирования высвобождения, растворитель, поверхностно-активное вещество, увлажняющее вещество, буферное вещество, наполнитель, смягчающее средство или их комбинации. Вспомогательные вещества, помимо тех, которые описаны в изобретении, могут включать вспомогательные вещества, приведенные, но этим не ограничивая, в монографии Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2005). Отнесение вспомогательного вещества в изобретении к конкретной группе (например, "растворитель") преследует только иллюстративные цели, и не ограничивает функциональную роль вспомогательного вещества. Конкретное вспомогательное вещество может попадать во многие группы на основе функциональной классификации.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, для лечения животных или людей). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой продукт лечебного питания (например, продукт лечебного питания для животных). Продукт лечебного питания включает в себя пищевой продукт, который находится в композиции, предназначенной для потребления или наружного применения под наблюдением врача (например, ветеринарного врача) и который предназначен для специфической диетотерапии состояния, для которого предъявляются характерные особые требования к питанию, основанные на общепризнанных научных принципах, установленных в результате медицинских исследований. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

во. В некоторых вариантах осуществления термин "фармацевтически приемлемое" вещество означает вещество, одобренное органом государственного управления или органом управления штата или приведенное в Фармакопее США или в других общепризнанных международных фармакопеях для применения на животных, и, более конкретно, на людях.

В случае перорального введения композиции, клетки *M. elsdenii* (например, лиофилизированные клетки) или кормовая добавка могут быть объединены с хорошо известными вспомогательными веществами. Такие носители могут, например, позволять приготавливать клетки *M. elsdenii* или кормовую добавку по изобретению в форме таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, шламов, суспензий и в других подобных формах, для перорального введения субъекту, подвергаемому лечению. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой таблетку, пилюлю, капсуловидную таблетку или капсулу. Подходящие вспомогательные вещества включают, но этим не ограничивая, наполнители, такие как сахара, в том числе, но этим не ограничивая, лактоза, сахароза, маннит, и сорбит; целлюлозные составы, такие как, но этим не ограничивая, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметил-целлюлоза натрия и поливинилпирролидон (PVP). При необходимости могут быть добавлены разрыхлители, такие как, но этим не ограничивая, структурированный поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Композиции, которые могут применяться перорально, включают, но этим не ограничивая, капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма представляет собой лекарственную форму из растительного сырья, которую не изготавливают из компонентов веществ животного происхождения и которая не содержит какие-либо такие компоненты. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма из растительного сырья представляет собой капсулу из растительного сырья.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к капсуле, включающей описанные в изобретении клетки *M. elsdenii* (например, лиофилизированные клетки) и/или кормовую добавку. В некоторых вариантах осуществления капсула представляет собой желатиновую капсулу. В некоторых вариантах осуществления капсула включает описанные в изобретении лиофилизированные клетки *M. Elsdenii*, полученные описанным в изобретении способом, или кормовую добавку. В некоторых вариантах осуществления капсула является биоразлагаемой. В некоторых вариантах осуществления капсула представляет собой биоразлагаемую желатиновую капсулу.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к инкапсулированной лиофилизированной композиции, включающей анаэробные бактериальные клетки, где лиофилизированный порошок инкапсулируют путем распределения лиофилизированного порошка в нагретом масле. В другом аспекте настоящее изобретение относится к инкапсулированной лиофилизированной композиции, включающей клетки *M. elsdenii*, где лиофилизированный порошок инкапсулируют путем распределения лиофилизированного порошка в нагретом масле.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам или упаковкам, включающим описанные в изобретении клетки *M. elsdenii*, кормовые добавки, корма и/или композиции. Наборы или упаковки могут включать комплекты кормовой добавки, корма, композиции или их комбинаций (например, один или более комплектов). В некоторых вариантах осуществления набор включает лиофилизированные клетки, полученные раскрытым в изобретении способом, описанную в изобретении кормовую добавку или описанную в изобретении капсулу.

Способы введения животным клеток анаэробных бактерий, клеток аэробных бактерий и/или клеток дрожжевых грибов

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеток *M. elsdenii*.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу введения животному клеток *Megasphaera*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеток анаэробных бактерий. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеток *Bifidobacterium*, таких как *B. breve*, клеток *Lactobacillus*, таких как *L. plantarum*, клеток *Bifidobacterium*, таких как *B. animalis subsp. lactis*, клеток *Pediococcus*, таких как *P. acidilactici*, клеток *Lactobacillus*, таких как *L. casei cells*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеток аэробных бактерий. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеткам *Bacillus*, таких как клетки *B. subtilis*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеткам дрожжевых грибов. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу введения животному клеткам *Saccharomyces*, таких как клетки *S. boulardii* и клетки *S. cerevisiae*.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение животному описанных в изобретении клеток *M. elsdenii*, кормовой добавки, корма или композиции (например, капсулы).

Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, в том числе, например, перорально (то есть, путем проглатывания жидких или твердых пероральных киселя, кормовой добавки, корма, композиции или капсулы), путем распыления на тело (то есть, путем тонкого распыления) и/или путем инъекции.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение твердого вещества, жидкости или геля, содержащего клетки *M. elsdenii*.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение твердой кормовой добавки, содержащей клетки. В некоторых вариантах осуществления твердая кормовая добавка представляет собой порошок (например, сыпучий порошок), гранулу (то есть, гранулят), частицу (то есть, твердые частицы), микросферу, брикет, водорастворимый концентрат, пасту, пилюлю, таблетку, dust, их компонент, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение жидкой кормовой добавки, включающей клетки. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение клеток в жидкость. В некоторых вариантах осуществления жидкость представляет собой раствор (например, водный, органический или водно-органический раствор), суспензию, эмульсию, кисель, спрей, инъекционный препарат, напиток (например, заменитель молока), их компонент или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления жидкость вводят перорально или путем распыления жидкости на животное.

В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение клеток *M. elsdenii* или кормовой добавки, включающей клетки, с другой кормовой добавкой для животного с формированием добавки или заранее приготовленной смеси для введения в корм животного. В некоторых вариантах осуществления другая кормовая добавка включает клетки, не являющимися клетками *M. elsdenii*.

В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdenii* (например, лиофилизированные клетки) могут быть добавлены к кормовой добавке в форме жидкости (например, в форме бульона или мясного бульона, включающего, например, регидратированные лиофилизированные клетки), в форме пасты ресуспендированных клеток или в форме лиофилизированных (например, лиофилизированных) клеток. Микроорганизмы, включающие лиофилизированные *M. Elsdenii*, могут быть также инкапсулированы перед добавлением в кормовую добавку. Могут быть также приготовлены лекарственные формы (например кисель заданного объема или капсулы), и, при необходимости, микроорганизмы могут быть добавлены непосредственно в корм животного путем опрыскивания жидким бульоном и/или лиофилизированными клетками поверхности корма или путем смешения с кормом.

В некоторых вариантах осуществления способ включает регидратирование твердой кормовой добавки (например, порошка, гранулята, твердых частиц, микросфер, брикета, лиофилизированных клеток или их комбинаций) с получением жидкости для введения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение клеток *M. elsdenii* на корм животного с помощью системы доставки, которая регидратирует твердую кормовую добавку или лиофилизированные клетки, в том числе и на основе обеспечения однородности смеси от партии к партии. Например, лиофилизированный порошок может быть загружен из поливинилового бункерного питателя в промывочную систему, которая разбавляет порошок и орошает им корм, предназначенный для смешения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение клеток *M. elsdenii* на корм животного с использованием объемного дозатора с бункером для хранения. Например, лиофилизированные клетки (например, порошок, включающие клетки) могут храниться в бункере для хранения и разгружаться в ванну с водой или жидкостью непосредственно перед распыливанием на корм животного.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения состояния или расстройства, связанного с продукцией молочной кислоты в желудочно-кишечном тракте животного, включающему введение животному эффективного количества описанных в изобретении клеток *M. elsdenii* (например, лиофилизированных клеток), лиофилизированных клеток *M. Elsdenii*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции (например, капсулы).

В некоторых вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ацидоз. В некоторых вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой рубцовый ацидоз. В некоторых вариантах осуществления, состояние или расстройство представляет собой респираторное заболевание. В некоторых вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой ламинит. В некоторых вариантах осуществления состояние или расстройство представляет собой инфекцию. В некоторых вариантах осуществления инфекция вызвана сальмонеллой или кампилобактером. В некоторых вариантах осуществления сальмонелла представляет собой *Salmonella enterica* и/или *Salmonella bongori*. В некоторых вариантах осуществления серологическим типом сальмонелла является *Salmonella Typhimurium* и/или *Entititidis*. В некоторых вариантах осуществления кампилобактер представляет собой *Campylobacter jejuni* или *Campylobacter coli*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения или снижения роста условно-патогенного микроорганизма в желудочно-кишечном тракте животного, включающему введение животному эффективного количества описанных в изобретении клеток *M. elsdenii* (например, лио-

филизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции.

В некоторых вариантах осуществления условно-патогенный микроорганизм является патогенным. В некоторых вариантах осуществления, условно-патогенный микроорганизм представляет собой сальмонеллу или кампилобактер. В некоторых вариантах осуществления сальмонелла представляет собой *Salmonella enterica* и/или *Salmonella bongori*. В некоторых вариантах осуществления серологическим типом сальмонеллы является *Salmonella Typhimurium* и/или *Enteritidis*. В некоторых вариантах осуществления кампилобактер представляет собой *Campylobacter jejuni* или *Campylobacter coli*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения биодоступности содержащегося в растениях фосфора в рационе животного, включающему введение животному эффективного количества описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки *M. elsdeni* обладают фитазной активностью. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет уменьшать загрязнение окружающей среды фосфорсодержащими отходами, возникающими вследствие применения пищевого рациона животного, не содержащего клеток *M. elsdeni*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу улучшения показателя роста у животного, включающему введение животному эффективного количества описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции. В некоторых вариантах осуществления улучшение показателя роста у животного означает увеличение потребления корма, средней суточной массы, коэффициента кормоотдачи, прироста массы животного, надоя молока у дающего молоко животного, яйценоскости у домашней птицы, минерализации кости или их комбинаций.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу подкисления нижнего отдела желудочно-кишечного тракта животного, включающему введение животному эффективного количества описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции. В некоторых вариантах осуществления нижний отдел желудочно-кишечного тракта представляет собой слепую кишку домашней птицы.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении клетки *M. elsdeni* (например, лиофилизованные клетки), лиофилизованные клетки *M. Elsdeni*, полученные описанным в изобретении способом, описанную в изобретении кормовую добавку или описанную в изобретении композицию вводят до, одновременно или после получения животным корма.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает смешение описанных в изобретении лиофилизованных клеток *M. elsdeni*, лиофилизованных клеток, полученных описанным в изобретении способом, или описанной в изобретении твердой кормовой добавки с жидкостью перед введением.

В некоторых вариантах осуществления жидкость вводят перорально (например, пероральный кисель) или путем опрыскивания (например, мелкокапельного опрыскивания) животного жидкостью.

В некоторых вариантах осуществления способ включает однократное введение описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции.

В некоторых вариантах осуществления способ включает ежедневное введение описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции. В некоторых вариантах осуществления введение проводят по меньшей мере один раз в день, по меньшей мере два раза в день, по меньшей мере три раза в день или более чем три раза в день. В некоторых вариантах осуществления введение проводят без ограничения (например, путем самостоятельного введения животным путем питья доступной для него жидкости или путем скармливания доступного для него корма, включающих клетки *M. elsdeni* (например, лиофилизованные клетки), лиофилизованные клетки *M. Elsdeni*, полученные описанным в изобретении способом, кормовую добавку или композицию).

В некоторых вариантах осуществления способ включает более чем одно введение в течение одного дня описанных в изобретении клеток *M. elsdeni* (например, лиофилизованных клеток), лиофилизованных клеток *M. Elsdeni*, полученных описанным в изобретении способом, описанной в изобретении кормовой добавки или описанной в изобретении композиции. В некоторых вариантах осуществления, введение проводят два, три, четыре, пять, шесть или более раз в течение одного дня. В некоторых вариантах осуществления способ включает более чем одно введение в течение одного дня, за которым следует один или более дней без проведения введения. В некоторых вариантах осуществления один или более дней без проведения введения означает один, два, три, четыре, пять или шесть дней, одну неделю, две

недели, три недели или четыре недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев или шесть месяцев без проведения введения.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой жвачное животное. В некоторых вариантах осуществления жвачное животное может представлять собой, но этим не ограничивая, крупный рогатый скот, буйвола, овцу, козу, оленя, северного оленя, лося, жирафа, яка и марала. В некоторых вариантах осуществления жвачное животное выбирают из группы, состоящей из крупного рогатого скота, буйвола, овцы, козы, оленя и северного оленя.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой нежвачное животное. В некоторых вариантах осуществления нежвачное животное может представлять собой, но этим не ограничивая, лошадей, домашнюю птицу, свиней, собак и кошек. В некоторых вариантах осуществления нежвачное животное выбирают из группы, состоящей из лошадей, домашней птицы и свиней.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой животное из зоопарка.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица представляет собой отряд пернатых (то есть, отряд птиц), которых используют в качестве животных, служащих пищей для человека, в том числе, но этим не ограничивая, курицу, гуся, утку, перепелку, индейку, голубя, эму или страуса. В некоторых вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из курицы, гуся, утки, перепелки, индейки или голубя. В некоторых вариантах осуществления домашнюю птицу выбирают из группы, состоящей из бройлера, племенного бройлера и курицы-несушки. В некоторых вариантах осуществления домашняя птица представляет собой курицу.

В некоторых вариантах осуществления животное относится к семейству лошадиных. В некоторых вариантах осуществления семейство лошадиных включает лошадь, пони, осла или мула.

Примеры

Далее представлены примеры, которые вместе с приведенным выше описанием иллюстрируют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, но при этом не ограничивая объем изобретения.

Пример 1. Влияние температуры на выход жидких культур *M. elsdenii*.

Проводили оценку влияния температуры хранения при 4°C, 20°C и 39°C на жизнеспособность клеток в жидких культурах *M. elsdenii* NCIMB 41125 (Lactipro®) после 0, 7, 14, 21 и 28 дней хранения. Результаты показали, что хранение продукта при 4°C значимо ($P < 0,001$) улучшало жизнеспособность культуры по сравнению с хранением при 20 или 39°C, независимо от дня отбора проб. Через 28 дней, продукт, который хранили при 4°C, характеризовался величиной $3,98 \times 10^6$ колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл) по сравнению со значениями $1,26 \times 10^6$ и $6,3 \times 10^5$ КОЕ/мл для продукта, который хранили при 20°C или 39°C соответственно ($P < 0,01$; фиг. 1). Таким образом, эти результаты показывают, что снижение температуры хранения улучшает жизнеспособность жидких культур *M. elsdenii* NCIMB 41125.

Дополнительные результаты отдельного исследования показывают, что выход *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 в жидкой культуре (Lactipro advance®) снижается после 0, 7, 14, 21 и 28 дней хранения при комнатной температуре (фиг. 2).

Пример 2. Применение тангенциальной поточной фильтрации для концентрирования культур *M. elsdenii*.

Исследовали тангенциальную поточную фильтрацию (TFF) в качестве метода концентрирования больших объемов культуры с высокой производительностью.

Систему TFF в полупромышленном масштабе (см. фиг. 3) интегрировали в производственную линию для получения *M. elsdenii* и проводили испытания при производительности циклов 500 литров (л) для оценки полупромышленной системы при значениях уменьшения объема на 70%, 80% и 90%. Использовали модуль TFF с одной мембраной из регенерированной целлюлозы с отсекаемой молекулярной массой 100 кДа (высота канала 0,875 мм). Проводили по три производственных цикла для каждого значения уменьшения объема, всего суммарно девять циклов. Собирали образцы для каждого цикла и проводили анализ величины pH, оптической плотности (OD), присутствия или отсутствия аэробных примесей, осмолярности, характеристик летучих жирных кислот, концентрации *M. elsdenii* и характеристик роста. Собирали образцы девяти культур *M. elsdenii* ("нелиофилизированные") перед началом фильтрации, из пермеата ("пермеат"), который представляет собой объем, удаляемый системой, и из ретентата ("ретентат"), который представляет собой объем сконцентрированной культуры *M. Elsdenii*, включающий клетки, которые остаются после уменьшения объемов.

Образцы пермеата, собранные в начале, в середине и в конце процесса концентрирования, имели показатели OD, согласующиеся с величинами уменьшения объема, все ниже 0,045 (данные не показаны). Количество *M. elsdenii*, извлеченное в пермеат, повышалась на протяжении всего процесса концентрирования ($P=0,0006$), но было все же пренебрежимо малым (меньшим, чем 3×10^4 КОЕ/мл) по сравнению с количеством клеток, собранных в ретентата ($< 0,002\%$). Уменьшение величины объемов не влияет на концентрацию *M. Elsdenii*, извлекаемых в пермеат ($P > 0,9$; табл. 2).

Таблица 2. Средний выход *M. elsdenii* в образцах, собранных на протяжении девяти производственных циклов, проведенных для оценки полупромышленной системы TFF при уменьшении объемов на 70%, 80% и 90%

Образцы	КОЕ/мл, \log_{10}			Стандартная ошибка	Влияние обработки, P-значение
	70%	80%	90%		
Пермеат	1,19	1,07	1,12	0,40	0,958
Ретентат	8,99	9,04	9,25	0,03	< 0,0001

Выход *M. elsdenii* в ретентате не отличался в пакетах, собранных в начале, в середине или в конце каждого процесса сбора в пакеты ($P=0,6088$; данные не показаны). На выход ретентата влияли уровни уменьшения объемов ($P < 0,0001$; табл. 2 и фиг. 4). Уменьшение объема ретентата на 90% характеризовалось более высоким выходом, чем при уменьшении объема ретентата на 70 и на 80% ($P < 0,0001$). Но результаты для 70 и 80% ретентата не отличались друг от друга ($P > 0,09$).

Процесс фильтрации не влиял на способность клеток *M. elsdenii* к росту при инокулировании их опять в среде SDL-20 (табл. 3). На наклон кривых фазы экспоненциального роста не оказывало влияние уровня уменьшения объема ($P > 0,3$), но на них влиял тип образца: "ретентат" по сравнению с "нелиофилизированный" ($P < 0,001$). На временной лаг оказывало влияние как уровень уменьшения объема, так и тип образца ($P < 0,001$). Разрыв во времени для ретентата снижался с ростом уменьшения объема, что отражало более высокую концентрацию клеток.

Таблица 3. Сравнения наклона кривых и временного лага между исходными *M. elsdenii* (до фильтрации=нелиофилизированный) и ретентатом (после фильтрации), собранными во время циклов TFF с различными уровнями уменьшения объемов

	Тип образца						Влияния, P-значения		
	Нелиофилизированный			Ретентат			Тип образца	Уменьшение объема	Взаимодействие
	70%	80%	90%	70%	80%	90%			
Наклон	0,39	0,36	0,37	0,44	0,42	0,43	<0,001	0,329	0,979
Временной лаг, час	1,42 ^a	1,10 ^b	1,07 ^b	0,32 ^c	0,29 ^c	0,24 ^c	0,001	<0,001	<0,001

Пример 3. Параметры замораживания и лиофилизации для *M. elsdenii*.

А. Замораживание и лиофилизация ретентатов.

Ретентаты, полученные в результате проведения TFF, использовали для испытания протоколов замораживания, введения криопротектора и различных параметров лиофилизации.

Ретентаты переносили в стерильные дегазированные флаконы для сывороток и асептически смешивали с различными составами криопротекторов (в отношении веса к объему): без криопротектора (Ctrl), обезжиренное молоко (SM), трегалоза (T), и бетаин. Отбирали образцы ретентатов, смешанных с соответствующим криопротектором, для определения концентрации *M. elsdenii* перед лиофилизацией (то есть, подсчета жизнеспособности). Смеси переносили во флаконы объемом 10 мл (по 4 мл/флакон) и быстро замораживали в жидком азоте или медленно замораживали при -80°C в течение ночи. Флаконы переносили в лиофилизатор для проведения лиофилизации с использованием или медленного, или быстрого цикла. После завершения лиофилизации, определяли выживание бактерий путем ресуспендирования лиофилизованного продукта в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, регидратирования его в течение 40 мин при комнатной температуре и затем высевания на agarе SDL20.

Потерю клеток подсчитывали путем вычитания концентрации клеток *M. elsdenii*, восстановленных после лиофилизации, из исходной концентрации клеток *M. Elsdenii*, измеренной в соответствующем ретентате, смешанным или не смешанным с криопротекторами. Использовали программное обеспечение SAS® для расчета данных по потере клеток путем анализа взаимодействий между уровнями уменьшения объема (70%, 80% или 90%), циклом лиофилизации (медленный в сопоставлении с быстрым), методом замораживания (-80°C в сопоставлении с жидким азотом), криопротекторами (в отсутствие криопротектора, бетаин, трегалоза, обезжиренное молоко, мальтодекстрин, трегалоза/обезжиренное молоко (T/SM), и мальтодекстрин/обезжиренное молоко (M/SM)).

Потеря клеток, наблюдаемая при контрольной обработке (в отсутствие криопротекторов), вне зависимости от других критериев, составляла величину $5 \log$ (КОЕ/мл) или выше. Аналогично этому, потеря клеток, наблюдаемая при обработке бетаином, вне зависимости от других критериев, составляла $3,96 \log$ КОЕ/мл или выше. В качестве приемлемого предельного значения потери устанавливали значение $1,6 \log$ КОЕ/мл. Ретентаты, смешанные с T/SM или M/SM, были все ниже этого порогового значения, вне зависимости от используемого цикла лиофилизации или метода замораживания, за исключением

T/SM замораживания при -80°C и лиофилизации с использованием медленного или быстрого цикла (фиг. 5).

В. Влияние условий лиофилизации на хранение.

Клетки *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 концентрировали в 10 раз с использованием устройства для фильтрации, и проводили исследование лиофилизации, испытывая различные характеристики: быстрое или медленное исходное замораживание (жидкий азот в сравнении с -20°C), в присутствии или отсутствии трегалозы (0%, 4%, 7,5% и 10%), и плавный или быстрый циклы лиофилизации (38 ч при 2×10^{-6} мм рт.ст. в сравнении с 16,5 ч при 135×10^{-6} мм рт.ст.). Все подвергнутые испытаниям процессы лиофилизации позволяли получать продукты, которые сохраняли достаточную жизнеспособность для инициирования роста культуры после регидратирования, даже после длительного хранения в течение от 4 до 12 месяцев при комнатной температуре. Тем не менее, наблюдались различия в жизнеспособности бактерий в зависимости от используемых характеристик лиофилизации (фиг. 6). Медленное замораживание, введение 7,5% трегалозы и стадии плавной лиофилизации с поддержанием конечной активности воды выше 0,04 обуславливали более высокую выживаемость клеток *Megasphaera elsdenii*.

С. Влияние криопротекторов на жизнеспособность лиофилизированных клеток *M. elsdenii*.

Центрифугированные концентраты клеток *M. elsdenii* NCIMB 41125 ресуспендировали в молочной смеси для детского питания перед лиофилизацией, в результате чего достигалось только 1-log снижения жизнеспособности клеток при последующем регидратировании клеток. Испытывали добавление 4% трегалозы и 7,5% обезжиренного молока к концентрату клеток *M. elsdenii* перед медленным замораживанием при -80°C или мгновенным замораживанием в жидком азоте для определения потери клеток, обнаруживаемой во время проведения процесса исходного замораживания. Как показано на фиг. 7, мгновенное замораживание в присутствии 4% трегалозы или 7,5% обезжиренного молока давало самое высокое извлечение жизнеспособных клеток (0,79 log снижения числа жизнеспособных клеток). Продукт без добавления криопротекторов, вне зависимости от используемого метода замораживания, терял от 2,34 до 1,95 log КОЕ/мл клеток *Megasphaera elsdenii*.

Пример 4. Влияние условий хранения на выход и стабильность лиофилизированных клеток *M. elsdenii*.

Для определения влияния протоколов лиофилизации и условий хранения на характеристики роста и срок годности клеток *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, ретентат, полученный при 90% уменьшение объема, смешивали с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (T/SM) или с 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (M/SM), замораживали при -80°C или в жидком азоте (LiqN) и лиофилизировали с использованием быстрого цикла. Затем образцы ретентата подвергали исследованию с определением характеристик бактериального роста и выживаемости клеток во время хранения при 4 или 25°C в аэробных или анаэробных условиях в течение 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 и 24 недель, используя анализ кривой роста и метод распределяемого пластинчатого посева. Вкратце, отбирали образцы хранимых продуктов, последовательно их разбавляли, и высевали в чашке с агаровой средой SDL. Кроме этого, среду для выращивания (SDL) инокулировали (1:100) с помощью регидратированных лиофилизированных продуктов и регистрировали оптическую плотность (OD, 600 nm) до момента достижения культурой стационарной фазы. Эксперимент повторяли в 3 разных дня и все обработки проводили в трех параллельных опытах. Регидратированные лиофилизированные образцы разбавляли, для того чтобы построить кривые роста, так как без разбавления, величина поглощения превышала допустимый порог, вследствие присутствия обезжиренного молока. Для облегчения сравнения кривых роста, то же самое разбавление проводили на нелиофилизированных образцах, используемых в качестве контроля.

Результаты. Образцы лиофилизировали и хранили при комнатной температуре или при 4°C в аэробных или анаэробных условиях в течение 6 месяцев. Образцы, хранимые в аэробных условиях, вне зависимости от обработки, быстро разлагались с дополнительной потерей клеток по сравнению с их анаэробным аналогом в диапазоне от 0,4 до 3,2 log после только 2 недель хранения. На основе этих результатов и для повышения наглядности изображенных на фигуре данных, на фиг. 8 представлена только потеря клеток, наблюдаемая в лиофилизированных продуктах, хранимых анаэробно. В процессе хранения в анаэробных условиях, образцы, хранимые при комнатной температуре, разлагались быстрее, чем их аналоги, хранимые при 4°C , за исключением T/SM образцов, замороженных в жидком азоте. T/SM образцы, замороженные в жидком азоте и хранимые при комнатной температуре, после лиофилизации не теряли статистически значимо больше клеток, чем их аналоги, хранимые при 4°C в течение периода хранения 16 недель ($P > 0,1$). Однако, различия между образцами становились статистически значимыми в случаях хранения при комнатной температуре и при температуре 4°C после 20 недель хранения ($P=0,0002$), с разницей 0,84 log после 20 недель и с разницей 0,89 после 24 недель хранения. Все M/SM образцы разлагались быстрее, чем их T/SM аналоги. После 24 недель хранения (фиг. 9), потери клеток в T/SM образцах, замороженных в жидком азоте и хранимых при 4°C в анаэробных условиях, были значительно ниже, чем при любых других обработках ($P < 0,02$). T/SM образцы, замороженные в жидком азоте и хранимые при 4°C в анаэробных условиях, имели 2,16 log потерь по сравнению с концентрацией *M. Elsdenii*, наблюдаемой перед лиофилизацией, с 0,82 log потерь, возникающих вследствие хранения в течение

24 недели. В каждый день отбора проб, проводили эксперимент по получению кривой роста для сравнения характеристик роста лиофилизированных продуктов с нелиофилизированным продуктом. На фиг. 10 приведены кривые роста, полученные на образцах, замороженных в жидком азоте, лиофилизированных с использованием быстрого цикла (18,5 ч при 250×10^{-3} мм рт.ст.) и хранимых анаэробно при 4°C или при комнатной температуре. Нелиофилизированные образцы, используемые для каждой кривой роста, были "свежими" (полученными не более чем за 2 дня до проведения эксперимента). Лيوфилизированный продукт, хранимый при 4°C, имел более короткий временной лаг, чем лиофилизированный продукт, хранимый при комнатной температуре, что согласуется с разницей концентраций *M. Elsdenii*, наблюдаемой в этих образцах (табл. 4). После 16 недель хранения Т/SM образцы, вне зависимости от температуры хранения, имели более короткий временной лаг, чем М/SM образцы.

Таблица 4. Временной лаг, наблюдаемый на нелиофилизированном или регидратированном лиофилизированном образце, полученном из ретентата при 90% уменьшение объема, смешанном с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (Т/SM) или 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (М/SM), замороженном в жидком азоте (LiqN) и лиофилизированном с использованием быстрого цикла после 12, 16, 20 или 24 недель хранения в анаэробных условиях при 4 или 25°C

	Временной лаг (часы) после X недель хранения					
	12	16	20	24	Среднее значение	Стандартное отклонение
Lactipro	2,50	2,75	3,75	1,75	2,69	0,72
М/SM хранение при 25°C	8,50	9,00	10,00	11,75	9,81	1,24
Т/SM хранение при 25°C	6,50	6,75	7,25	8,00	7,13	0,57
М/SM хранение при 4°C	5,75	8,25	8,00	8,75	7,69	1,15
Т/SM хранение при 4°C	4,25	5,25	5,00	4,75	4,81	0,37

Углы наклона кривых для нелиофилизированных образцов и подвергнутых MSM обработке, хранимых при 25°C в течение 12 недель, и подвергнутых MSM обработке, хранимых при 20°C в течение 16 недель, были аномально низкими (табл. 5). После 20 и 24 недель хранения, углы наклона кривых фазы экспоненциального роста лиофилизированных образцов численно не отличались от нелиофилизированных контрольных образцов.

Таблица 5.

Углы наклона кривых фазы экспоненциального роста, наблюдаемые на нелиофилизированном или регидратированном лиофилизированном образце, полученном из ретентата при 90% уменьшение объема, смешанном с 8% трегалозы/15% обезжиренного молока (Т/SM) или 8% мальтодекстрина/15% обезжиренного молока (М/SM), замороженном в жидком азоте (LiqN) и лиофилизированном с использованием быстрого цикла после 12, 16, 20 или 24 недель хранения в анаэробных условиях при 4°C или 25°C

	Углы наклона кривых фазы экспоненциального роста после X недель хранения					
	12	16	20	24	Среднее значение	Стандартное отклонение
Lactipro	0,22	0,31	0,34	0,31	0,30	0,04
М/SM хранение при 25°C	0,24	0,18	0,33	0,29	0,26	0,05
Т/SM хранение при 25°C	0,31	0,30	0,34	0,32	0,32	0,02
М/SM хранение при 4°C	0,30	0,33	0,30	0,30	0,31	0,01
Т/SM хранение при 4°C	0,32	0,31	0,33	0,32	0,32	0,01

Пример 5. Эффективность и безопасность применения лиофилизированных клеток *M. elsdenii* на крупном рогатом скоте

А. Приготовление лиофилизированного продукта и срок его годности

Флаконы с используемой в этом исследовании предварительно регидратированной культуры *M. elsdenii* (для регидратирования и подкормки) приготавливали за 56 дней до начала эксперимента и хра-

нили в холодильнике при 4°C перед применением. Каждый флакон содержал эквивалент 5 мл лиофилизированного продукта. Флаконы лиофилизировали в 6 различных циклах лиофилизации. Для каждого цикла, 3 флакона регидратировали после лиофилизации, и 3 дополнительных флакона регидратировали в день проведения исследования для определения концентрации клеток *M. elsdenii* во флаконах (табл. 6).

Животным из группы с регидратированной культурой и группы с подкормкой каждому вводили содержимое флакона путем вливания в ротовую полость, эквивалентное 1.84×10^{10} КОЕ *M. elsdenii*.

Таблица 6. Концентрация *M. elsdenii* после лиофилизации и на день проведения исследования после 56 дней хранения при 4°C

Цикл лиофилизации флакона	КОЕ на флакон	
	После лиофилизации	На день проведения исследования
Цикл #1	2,37E+10	1,70E+10
Цикл #2	2,37E+10	1,97E+10
Цикл #3	3,31E+10	1,86E+10
Цикл #4	3,41E+10	1,81E+10
Цикл #5	1,98E+10	1,57E+10
Цикл #6	2,34E+10	2,14E+10
Среднее	2,63E+10	1,84E+10

После начала эксперимента дополнительные флаконы и цикла #5 и #6 выдерживали при температуре 4°C и 3 флакона из каждого цикла этих циклов регидратировали каждый месяц (фиг. 11).

Концентрация *M. elsdenii* во флаконах изменялась от $4,96 \times 10^{10}$ КОЕ/г до $4,17 \times 10^{10}$ КОЕ/г при хранении в течение 11 месяцев при 4°C, представляя только величину 0,07 log потери выхода.

Используемые в этом исследовании продукты в форме ежедневно подкормленной культуры *M. elsdenii* (обработка с целью подкормки) приготавливали приблизительно за 30 дней до начала эксперимента и хранили в морозильнике в пакетах из кашированного фольгой полиэтилена. Подкормленные продукты лиофилизировали в 6 различных циклах лиофилизации, расфасовывали в 15 индивидуальных пакетах из кашированного фольгой полиэтилена (1 пакет/сутки на корм), продували азотом, герметизировали и хранили при -80°C до момента использования. Для каждого цикла лиофилизации, 3 пакета регидратировали после лиофилизации. Средняя концентрация *M. elsdenii* составляла 4×10^{10} КОЕ/пакет. Три дополнительных пакета регидратировали в начале каждой недели и использовали для определения вводимой животным ежедневно концентрации *M. elsdenii*, путем добавления регидратирующего раствора к клеткам *M. elsdenii*, выдерживания клеток в течении 40 мин для их оседания, разбавления клеток и высевания клеток (фиг. 12). Статистический анализ показывал увеличение концентрации клеток в течение времени. Весь продукт приготавливали за 30 дней до начала исследования, и продукт, используемый в качестве подкормки, имел срок после приготовления приблизительно 80 дней к концу исследования. Животные получали в среднем $2,19 \times 10^8$ КОЕ *M. elsdenii* ежедневно ($2,45 \times 10^{10}$ КОЕ/пакет).

В. Исследование на крупном рогатом скоте.

Молодых кастрированных бычков (n=462; начальная масса тела 408 кг) отбирали по массе и распределяли случайным образом в одну из четырех групп обработки, состоящих из контрольной группы, не получающей *Megasphaera elsdenii* (17 загонов; 7 голов/загон); нелиофилизированной группы, получающей предварительно 50 мл продукта *M. Elsdenii*, содержащего 2×10^8 КОЕ/мл (10^{10} КОЕ *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125) (16 загонов; 7 голов/загон); регидратированной группы, получающей лиофилизированную культуру, которую предварительно регидратировали непосредственно перед введением (10^{10} КОЕ *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125) (16 загонов; 7 голов/загон); и группы подкормки, получающей лиофилизированную культуру, которую предварительно регидратировали непосредственно перед введением (10^{10} КОЕ *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125), и лиофилизированный продукт, который ежедневно вводили в рацион в качестве подкормки на протяжении всего исследования (10^8 КОЕ *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 ежедневно; 17 загонов; 7 голов/загон).

Нелиофилизированные, регидратированные группы и группу с подкормкой бычков помещали на 10-дневную программу наращивания после предварительного получения ими киселя *Megasphaera elsdenii*, в то время как контрольную группу помещали на 21-дневную программу наращивания. Рубцовую жидкость извлекали путем руминоцентаза через 26 ч после того, как был введен первый рацион. Образцы рубцовой жидкости анализировали на pH, на концентрации летучих жирных кислот, на уровни эндотоксина и на способность утилизировать молочную кислоту в *in vitro* исследовании на исчезновение лактата. Для исследования исчезновения лактата десять пробирок объемом 10 мл, содержащих полуопределенную лактатную среду, инокулировали 0,1 мл рубцовой жидкости. Оптическую плотность измеряли в двух параллельных анализах каждые 6 ч в течение 24 ч для оценки способности к росту с молочной кислотой в качестве первичного субстрата. Пробирки помещали в морозильник сразу после измере-

ния оптической плотности для последующего определения концентрации молочной кислоты. Одного бычка на загон снабжали датчиком для непрерывного радиочастотного измерения величины pH в течение 56 дней исследования. Бычков взвешивали в дни 0,28 и 56 для определения среднего суточного увеличения массы, потребления сухого вещества и эффективности использования кормов.

Для оценки жизнеспособных *M. elsdenii*, проглатываемых животными, лиофилизированные продукты подкармливали стерилизованной мукой в алюминиевых чашках и собирали образцы после 0, 1, 2 и 4 ч воздействия окружающей атмосферы в лаборатории или на улице на солнце. Этот эксперимент повторяли 4 раза в течение июля и августа 2016 г. (фиг. 13). Статистический анализ позволил выявить время воздействия во взаимосвязи с условиями хранения ($P=0,0007$), влияние времени воздействия ($P < 0,0001$) и влияние условий хранения ($P < 0,0001$). Концентрация *M. elsdenii* в лиофилизированном продукте, смешанном с мукой и подвергнутом воздействию атмосферы в лаборатории, численно понижалась в течение 4-часового воздействия, но значимо не отличалась от их исходной концентрации. Концентрация *M. elsdenii* в образцах, подвергнутых уличному воздействию, снижалась намного быстрее. После 1 часа воздействия, только 6,4% исходно присутствовавших *M. Elsdenii*, были жизнеспособными. Концентрация *M. elsdenii* в образцах, подвергнутых уличному воздействию, значимо отличалась от исходной концентрации и от их аналогов, выдерживавшихся при комнатной температуре после 2 и 4 ч воздействия. Концентрация *M. elsdenii* в этих образцах сильно варьировали от одного эксперимента к другому, что подтверждается большой величиной стандартного отклонения. Это может быть отнесено за счет различий во внешних условиях (температуры и влажности), но также за счет различий используемых лиофилизированных продуктов, которые могли быть более или менее устойчивыми к воздействию температуры и влажности. Во время исследования животных лиофилизированный продукт смешивали с мукой непосредственно перед кормлением, и затем корм с подкормкой быстро помещали в кормушку. Животные, набрасывавшиеся на муку и, следовательно, на лиофилизированный продукт, по-видимому, проглатывали его менее чем через 1 ч после смешения. Если предположить, что продукт был проглочен не позже чем через час, то животные должны были получить приблизительно $1,4 \times 10^7$ КОЕ/голова/день жизнеспособных клеток (6,4% средней концентрации в продукте с подкормкой $2,2 \times 10^8$ КОЕ/голова/день).

Ускоренный рост бычков, обработанных с помощью *M. elsdenii*, приводил к аналогичной массе тела на 28-ой день ($P=0,53$; табл. 7), среднему суточному увеличению массы ($P=0,71$) и эффективности использования кормов ($P=0,69$). Обработка с прикормкой характеризовалась более низким потреблением сухого вещества, чем в контрольной группе ($P=0,05$). Проведение откорма в загонах в течение первых 56 дней откорма давало аналогичные результаты среди обработок ($P > 0,10$). С контрольной группой, в отношении которой применяли консервативный 21-дневный период наращивания, эти сходства между обработками указывают на то, что программы ускоренного наращивания могут быть выполнены с использованием любой из трех форм обработок с помощью *M. elsdenii* без отрицательных последствий для здоровья крупного рогатого скота или для проведения откорма в загонах.

Величина pH рубцовой жидкости (извлеченной через 26 часов после кормление первым рационом) была аналогичной среди обработок ($P > 0,10$; табл. 8). Обнаруживалось различие в суммарной концентрации летучих жирных кислот (VFA) в случае обработки с прикормкой, которая была значимо выше, чем в случае других обработок ($P < 0,01$). Обработка с подкормкой характеризовалась более высокой концентрацией ацетата, чем при регидратированной обработке ($P=0,02$). Несмотря на то, что обнаруживалась значимое различие в концентрации ацетата, отношение ацетат:пропионат было аналогичным среди обработок ($P=0,96$). Другие летучие жирные кислоты (VFAs) были аналогичными среди обработок ($P > 0,18$).

Концентрация эндотоксина в рубцовой жидкости (извлеченной через 26 ч после кормления первым рационом) была аналогичной среди обработок ($P=0,3462$; фиг. 14). Уровни эндотоксина измеряли в качестве показателя бактериального лизиса в рубце. Сообщалось, что страдающее ацидозом животное имеет уровни эндотоксина выше, чем 150000 единиц эндотоксина/мл. Все измеряемые в этом исследовании уровни эндотоксина были ниже этой пороговой величины вне зависимости от обработки.

Одного бычка в каждом из 32 загонov снабжали постоянно находящимся в рубце pH-датчиком (8 бычков/обработка), который регистрировал данные измерений величины pH рубцовой жидкости каждый час в течение 56 дней исследования (фиг. 15). Средние результаты измерений величины pH рубцовой жидкости для каждой обработки представлены с интервалами в 1 ч на фиг. 15. Выявляли влияния дня обработки ($P < 0,01$) на величину pH рубцовой жидкости. Были также выявлены воздействия обработки ($P < 0,01$) и дня кормления ($P < 0,01$) на величину pH рубцовой жидкости. Ускоренное увеличение обработок *M. elsdenii* не вызывало снижения средней величины pH рубцовой жидкости в состоянии клинического ацидоза. В дни усиленного кормления лиофилизированные обработки (регидратированные и с подкормкой) поддерживали более высокое значение pH рубцовой жидкости, чем в случае контрольной и нелиофилизированной обработок.

Таблица 7. Проведение откорма в загонах

Показатель	Контроль	Нелиофилизированный продукт	Регидратированный продукт	Подкормка	SEM	P-значение
Начальная масса тела, кг	409	407	408	408	5,53	0,69
Дни 1-28						
Средний суточный прирост, кг	2,54	2,49	2,41	2,44	0,082	0,71
Потребление сухого вещества, кг ¹	9,95 ^a	9,76 ^{a, b}	9,66 ^{a, b}	9,37 ^b	0,18	0,05
Прирост: корм	0,2559	0,2596	0,2489	0,2594	0,007	0,69
Масса тела через 28 дней, кг	480	477	476	476	5,94	0,53
Дни 1-56						
Средний суточный прирост, кг	2,14	2,15	2,12	2,10	0,04	0,81
Потребление сухого вещества, кг	10,36	10,58	10,32	10,46	0,16	0,64
Прирост: корм	0,2076	0,2047	0,2061	0,2006	0,006	0,76
Масса тела через 56 дней, кг	534	534	533	531	5,8	0,75

¹ Средние значения в строке цифр без общих буквенных верхних индексов отличаются, P<0,05.

Таблица 8. Характеристики рубцовой жидкости через 26 часов после введения исходных рационов

Показатель	Контроль	Нелиофилизированный продукт	Регидратированный продукт	Подкормка	SEM	P-значение
pH	6,21	6,03	6,13	6,00	0,13	0,33
Летучая жирная кислота, мм ²						
Суммарно	86,3 ^a	88,1 ^a	81,1 ^a	93,5 ^b	3,97	<0,01
Ацетат	54,1 ^{a, b}	54,9 ^{a, b}	50,8 ^a	58,4 ^b	2,40	0,02
Пропионат	20,4	21,2	19,6	22,6	1,47	0,18
Бутират	10,3	10,6	9,4	10,8	0,73	0,44
Изобутират	0,24	0,15	0,09	0,21	0,08	0,20
Валерат	0,58	0,67	0,64	0,64	0,10	0,93
Изовалерат	0,67	0,61	0,50	0,66	0,11	0,23
Капроат	0,00	0,05	0,00	0,02	0,02	0,28
Отношение ацетат: пропионат	2,74	2,67	2,68	2,72	0,11	0,96

¹ Средние значения в строке цифр без общих буквенных верхних индексов отличаются, P<0,01.

Проводили измерения оптической плотности с интервалами 6 часов в течение периода 24 ч для определения кривых роста смешанных микробов рубца, инокулированных в полуопределенную лактатную среду, эти данные представлены на фиг. 16. Наблюдалось взаимное влияние между обработкой и временем определения (P < 0,02). Были также выявлены индивидуальные влияния обработки (P < 0,01) и времени (P < 0,01). Не обнаруживалось различий между обработками вплоть до 12 ч, после чего регидратированная лиофилизированная обработка давала более высокий результат, чем ежедневная лиофилизированная (P < 0,02) и контрольная (P=0,007). Через 24 ч не было различий между обработками *M. elsdenii* (P

> 0,10), но контрольная обработка имела значимо меньший микробный рост, чем все обработки *M. elsdenii* ($P < 0,01$).

На фиг. 17 приведены данные по исчезновению L-лактата полуопределенной лактатной среды, инокулированной смешанными микробами рубца и инкубированной в течение 0, 6, 12, 18 или 24 ч. Была выявлена взаимосвязь между обработкой и временем ($P=0,007$) наряду с влиянием обработки ($P=0,01$) и временем инкубации ($P < 0,0001$). Нелиофилизированная обработка содержала меньше L-лактата, чем другие обработки при часе 0 ($P=0,04$). Концентрации L-лактата были аналогичными среди обработок в моменты времени 6, 12 и 18 ч ($P > 0,10$). Подобно результатам, приведенным выше для измерений оптической плотности, микробы рубца контрольных бычков утилизировали меньше лактата ($P < 0,003$), чем в случае обработок *M. elsdenii* в совокупности при 24 ч инкубации, и при этом не обнаруживалось различий между обработками с помощью *M. Elsdenii* ($P > 0,10$). Эти данные показывают, что микробы из рубца бычков, обработанных с помощью *M. elsdenii*, росли более эффективно в полуопределенной лактатной среде, чем микробы из рубца контрольных бычков, что позволяет предположить о наличии более высокой способности в случае этих обработок утилизировать молочную кислоту. Кроме того, обработки с помощью *Megasphaera* давали аналогичные результаты относительно способности утилизации L-молочной кислоты.

Концентрации летучих жирных кислот (VFA) измеряли на образцах, которые использовали для определения оптической плотности и исчезновения лактата, и результаты представлены в табл. 9. Была обнаружена взаимосвязь между обработкой и временем ее проведения при определении концентраций VFA ($P=0,002$), ацетата ($P=0,0002$), изобутирата ($P=0,04$), бутирата ($P < 0,0001$), изовалерата ($P=0,0007$) и валерата ($P < 0,0001$), а также для отношения ацетат:пропионат ($P=0,02$). Влияния времени были обнаружены для суммы VFA и всех индивидуальных составляющих VFAs ($P < 0,0001$). Различия среди обработок были обнаружены для изобутирата ($P=0,02$), бутирата ($P=0,0004$) и валерата ($P=0,001$). Концентрации изобутирата были ниже в момент времени 18 ч для групп обработок с помощью нелиофилизированных продуктов и с подкормкой ($P < 0,005$ и $P < 0,004$ соответственно) по сравнению с контрольной группой и с группой, обработанной регидратированным продуктом. В момент времени 24 ч подкормка характеризовалась меньшим количеством изобутирата ($P=0,002$), чем обработки нелиофилизированным и регидратированным продуктом, но это количество было аналогично контрольной обработке ($P > 0,10$). Концентрации бутирата в случае регидратированных образцов были выше, чем в случае подкормки ($P=0,02$) после 18 ч инкубации. Контрольная обработка продуцировала меньше бутирата через 24 ч, чем обработки с помощью *M. elsdenii* ($P < 0,0001$). Различия в концентрации бутирата также обнаруживались среди обработок с помощью *Megasphaera* в этот момент времени в случае нелиофилизированных образцов, содержащих более высокую концентрацию, чем в случае обработки регидратированным продуктом ($P=0,01$). В момент времени 18 ч обнаруживали более низкую концентрацию валерата в случае регидратированного продукта по сравнению с другими обработками ($P=0,01$). Аналогичные результаты были получены для концентрации валерата и бутират при 24 ч инкубации. Контрольные обработки характеризовались меньшим содержанием валерата, чем все обработки с помощью *M. elsdenii* ($P < 0,0001$), при этом концентрации были выше в случае нелиофилизированных образцов, чем в случае регидратированных образцов ($P=0,03$). Не было обнаружено значимого влияния обработки на другие VFAs ($P > 0,05$). Были измерены незначительные концентрации изокапроата, капроата и гептаноата. Взаимосвязь обработка x время ($P=0,02$) была обнаружена для отношения ацетат:пропионат, а также для влияния времени ($P > 0,0001$), но была аналогичной для обработок ($P=0,57$).

Таблица 9. Изменения профиля летучих жирных кислот (VFA) полуопределенной лактатной среды, инокулированной смешанными микробами рубца

Показатель	Обработки				SEM	P-значение		
	Контроль	Нелиофилизированный продукт	Регидратированный продукт	Подкормка		Обработка	Час	Обработка x час
Суммарно VFA, мм						0,36	<0,0001	0,002
0 часов ¹	3,61	3,35	3,52	3,55	5,16			
6 часов ¹	6,41	7,17	7,79	6,62	5,16			
12 часов ²	7,64	8,58	17,27	7,80	5,16			
18 часов ³	63,01	49,48	56,45	53,73	5,16			
24 часа ⁴	46,23	78,35	67,22	74,77	5,16			

Ацетат, мМ						0,98	<0,0001	0,0002
0 часов ¹	3,07	3,02	3,07	2,92	2,15			
6 часов ¹	4,92	5,56	5,78	5,13	2,15			
12 часов ²	5,77	6,31	9,17	6,27	2,15			
18 часов ³	33,47	21,96	22,75	23,97	2,15			
24 часа ⁴	17,25	25,43	22,82	26,05	2,15			
Пропионат, мМ						0,24	<0,0001	0,08
0 часов ¹	0,01	0	0	0	2,44			
6 часов ¹	1,21	1,29	1,69	1,21	2,44			
12 часов ²	1,69	2,00	6,45	1,47	2,44			
18 часов ³	23,29	20,84	23,53	24,00	2,44			
24 часа ⁴	20,85	33,61	28,77	32,58	2,44			
Изобутират, мМ						0,02	<0,0001	0,04
0 часов ¹	0,03	Несущественная	Несущественная	Несущественная	0,03			
6 часов ¹	0,01	Несущественная	Несущественная	Несущественная	0,03			
12 часов ²	Несущественная	Несущественная	0,02	0,00	0,03			
18 часов ³	0,14 ^a	0,01 ^b	0,15 ^a	0,01 ^b	0,03			
24 часа ⁴	0,15 ^{a, b}	0,22 ^a	0,22 ^a	0,08 ^b	0,03			
Бутират, мМ						0,0004	<0,0001	<0,0001
0 часов ¹	0,08	0,06	0,08	0,09	0,52			
6 часов ¹	0,15	0,20	0,19	0,16	0,52			
12 часов ²	0,18	0,25	0,90	0,16	0,52			
18 часов ³	2,71 ^{a, b}	3,24 ^{a, b}	4,36 ^a	2,75 ^b	0,52			

24 часа ¹	3,46 ^a	8,80 ^b	7,06 ^c	7,46 ^{b,c}	0,52			
Изовалерат, мМ						0,9	<0,0001	0,0007
0 часов ¹	0,07	0,01	0,01	0,03	0,10			
6 часов ¹	0,03	0,01	0,02	0,03	0,10			
12 часов ²	Несущественная	Несущественная	0,11	Несущественная	0,10			
18 часов ³	0,52	0,29	0,75	0,26	0,10			
24 часа ⁴	0,72	1,24	1,06	0,93	0,10			
Валерат, мМ						0,001	<0,0001	<0,0001
0 часов ¹	0,14	0,10	0,16	0,17	0,54			
6 часов ¹	0,05	0,07	0,08	0,06	0,54			
12 часов ²	Несущественная	0,03	0,63	Несущественная	0,54			
18 часов ³	2,63 ^a	2,91 ^a	4,63 ^b	2,53 ^a	0,54			
24 часа ⁴	3,75 ^a	8,12 ^b	7,23 ^c	7,56 ^{b,c}	0,54			
Изокапроат, мМ						0,26	<0,0001	0,09
0 часов ¹	0,10	0,07	0,09	0,12	0,02			
6 часов ¹	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная	0,02			
12 часов ²	0,25	0,20	0,21	0,20	0,02			
18 часов ³	0,03	0,01	Несущественная	0,01	0,02			
Капроат, мМ						0,07	<0,0001	0,003

0 часов ¹	0,09	0,09	0,11	0,14	0,02			
6 часов ¹	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная	0,02			
12 часов ²	Несущественная	0,02	Несущественная	Несущественная	0,02			
18 часов ³	Несущественная	0,14	0,08	Несущественная	0,02			
24 часа ⁴	0,02	0,11	0,07	0,10	0,02			
Гептаноат, мМ						0,09	<0,0001	0,01
0 часов ¹	0,02	0,06	0,00	0,02	0,01			
6 часов ¹	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная				
12 часов ²	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная				
18 часов ³	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная				
24 часа ⁴	Несущественная	Несущественная	Несущественная	Несущественная				
Отношение ацетат: пропионат						0,57	<0,0001	0,02
0 часов ¹	0,06	Несущественное	Несущественное	Несущественное	0,18			
6 часов ¹	4,01	4,44	4,24	4,00	0,18			
12 часов ²	3,98	4,60	4,17	4,60	0,18			
18 часов ³	2,14	1,91	1,77	1,91	0,18			
24 часа ⁴	1,12	0,82	0,91	0,91	0,18			

^{1, 2, 3, 4} моменты времени без общего цифрового верхнего индекса отличаются, P<0,01.

^{a, b, c} Средние значения в строке цифр без общих буквенных верхних индексов отличаются, P<0,05.

Пример 6. Фитазная активность *Megasphaera elsdenii*.

Оценивали *in vitro* фитазную активность клеток *M. elsdenii*.

Клетки *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 культивировали в описанных в изобретении анаэробных условиях в полуопределенной лактатной среде, содержащей в качестве источника фосфора или неорганический фосфат (KН₂PO₄), или фитат. С интервалами в 2 ч от начала культивирования (0 ч) до 8 ч, 1 миллилитр (мл) образцов отбирали из культуры и центрифугировали с получением осадка клеток. Затем определяли фитазную активность в осадках клеток с использованием метода получения голубого окрашивания с молибдатом аммония. Смотрите публикацию Yanke et al., Microbiol. 144: 1565-1573 (1998). Вкратце, количественно определяли неорганический фосфат, выделяющийся в результате ферментативного расщепления в течение 30 мин инкубации при 37°C при pH 5,0, спектрофотометрическим методом при 700 нанометров (нм) и сравнивали со стандартной кривой. Фитазную активность определяли как количество неорганического фосфора, высвобождающегося из осадка клеток в минуту при условиях испытания.

На фиг. 18 показано, что рост клеток *Megasphaera elsdenii* в присутствии или отсутствии фитата вызывал значимую фитазную активность, что подтверждает то, что: (1) клетки *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 продуцируют фитазу, (2) продукция фитазы не ингибируется присутствием фосфора в среде, и (3) продукция фитазы клетками *Megasphaera elsdenii*, как очевидно, составляет большую величину в присут-

ствии фитата в среде.

Пример 7. Влияние клеток *Megasphaera elsdenii* на концентрацию и распространенность сальмонеллы.

Суточных бройлерных цыплят ($n=384$) случайным образом разделяли на четыре группы с различной обработкой: 1) контрольную группу, не получающую *Megasphaera*, 2) группу, имеющую свободный доступ без ограничения к кормушкам-бутылкам, содержащим жидкую культуру клеток *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, 3) группу, получающую ежедневно лиофилизированные клетки *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 с кормом, и 4) и группу, получающую жидкую культуру клеток *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 через пероральный желудочный зонд на день 0.

Каждая из четырех групп, подвергаемых обработкам, была представлена 16 клетками, содержащими по 6 птиц в каждой. Массы животных, потребление корма и превращение корма регистрировали в течение 15-дневного исследования. После периода 15-дневного кормления, выбирали случайным образом 2 животных из каждой клетки, забивали их, и извлекали слепую кишку для определения распространенности сальмонеллы. Вкратце, слепую кишку извлекали, помещали в пакеты со струнным замком и хранили на льду. Затем слепую кишку промывали 70% этанолом и вручную сжимали для извлечения содержимого. Один миллилитр извлеченного содержимого последовательно разбавляли в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) и высевали на агаре с бриллиантовым зеленым (BGA). Чашки с BGA инкубировали 24 ч при 37°C. Предполагаемые колонии сальмонеллы (розовые колонии) подсчитывали и подтверждали в качестве сальмонеллы, используя латексный тест FT0203 Oхoid для идентификации сальмонелл (Oхoid-Thermo Scientific, Hampshire, UK). Кроме того, один миллилитр образца содержимого слепой кишки добавляли к 9 мл бульон Раппопорта-Вассилиадиса (RV) для селективного обогащения сальмонелл. Если в чашках с BGA не обнаруживали заметного роста сальмонеллы, в чашки с BGA помещали бульон RV для обогащения, инкубировали в течение 24 ч при 37°C и оценивали на присутствие сальмонеллы. Образцы с отсутствием роста при прямом высевании, но проявляющие положительный рост при обогащении в бульоне RV, подвергали произвольному подсчету со шкалой 9 баллов (1 балл ниже теоретического порога обнаружения), и образцам с отсутствием роста ни при прямом высевании, ни при обогащении в бульоне RV, присваивали 0 баллов.

Результаты показали, что птицы, получающие лиофилизированный материал, имели в слепой кишке более низкую концентрацию сальмонеллы, выраженную числом колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл), с разницей - 1 log по сравнению с контрольной группой. См. фиг. 19. Распространенность сальмонеллы в образцах группы, подвергавшейся обработке лиофилизированным продуктом, также снижалась на 13% по сравнению с контрольной группой. См. фиг. 20.

Пример 8. Влияние клеток *Megasphaera elsdenii* на показатель роста и характеристики слепой кишки бройлерных цыплят

А. План эксперимента и обработки.

Проводили эксперимент в рандомизированном полноблочном плане с двадцатью четыремя репликами трех обработок с использованием самцов суточных бройлерных цыплят Cobb 500, возраст которых на момент начала обработки составлял одни сутки (Cobb-Vantress in Siloam Springs, Arkansas). Обработки представляли собой введение штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125 (MS-Biotec, Wamego, Kansas) или через пероральный желудочный зонд, или путем нанесения на поверхность тела птиц аэрозоля, и контрольную обработку (без *M. elsdenii*). Птиц размещали в 72 загонах, при этом в каждом загоне содержалось 35 птиц на начало эксперимента (суммарно 2520 птиц).

Перед введением *M. elsdenii*, фольгированные пакеты объемом 5 л со свежей культурой интенсивно встряхивали для гомогенизации содержимого. Трубки Тугон использовали для соединения ручного дозирующего устройства с пакетом. Резервуар дозирующего устройства постоянно заполняли и освобождали несколько раз для удаления воздуха. Считали, что содержимое не содержит окружающего воздуха, когда культура, которая содержит индикатор кислорода, сохраняла свой нормальный цвет.

Цыплят распределяли на группы по 35 особей, и регистрировали массу каждой группы. Группы птиц обрабатывали поблочно, при этом экспериментальные обработки назначались случайным образом внутри каждого блока.

Двадцать четыре загона (35 птиц/загон; суммарно 840 птиц) с помощью перорального желудочного зонда дозировали 0,2 мл свежей культуры, содержащей $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125, используя автоматически наполняемый шприц Scorex Classic 173.05005 (Ecublens, Switzerland). Лаборанты удерживали птиц путем использования большого и указательного пальца для поддержания клюва открытым в тот момент, когда содержимое шприца выпускали непосредственно в ротовую полость птиц.

Двадцать четыре загона (35 птиц/загон; суммарно 840 птиц) дозировали путем нанесения аэрозоля свежей культуры, содержащей $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125 с помощью пневматического устройства для распыления, снабженного наконечником для распыления. Птиц помещали в пластиковый таз (50 см×35 см×40 см), и на поверхность их тел наносили культуру в форме аэрозоля при объеме 60 мл на загон (~1,7 мл/птица).

Двадцать четыре загона (35 птиц/загон; суммарно 840 птиц) не имели контакта с *M. elsdenii* и служили в качестве контроля. Для предотвращения перекрестной контаминации подвергнутых обработке птиц, с контрольными птицами проводил манипуляции только назначенный специально персонал, который не имел контакта с подвергнутыми обработке птицами, и контрольных птиц помещали в специально предназначенные устройства для транспортировки с целью взвешивания и переноса в загон. В одном случае, была допущена ошибка при подсчете птиц, и загон 51 получил 33 птицы вместо 35 птиц в результате ошибки лаборанта.

В. Кормление и обеспечение водой.

Доступ к свежей воде обеспечивали без ограничения с помощью поилок (6 поилок/загон), соединенных с водопроводной сетью и установленных в подвешенном состоянии. Высоту установки поилки корректировали путем испытания на ее соответствие росту птиц. В табл. 10 ниже представлены пищевые рационы, используемые в эксперименте. Все рационы вводили в самотечные питатели, подвешенные в центре загона. Корм добавляли по мере необходимости для обеспечения неограниченного доступа на протяжении всего исследования. Пять килограмм начального рациона помещали в самотечные питатели перед размещением птиц в загонах.

Таблица 10. Композиции рационов

Ингредиент	Фаза рациона ^ψ		
	Начальная	Ростовая	Заключительная
Мука из зерновых культур	55,26	59,74	65,06
Мука из лущенных бобов сои	37,15	32,60	27,90
Соевое масло	3,10	3,35	3,10
Измельченный известняк	1,45	1,40	1,25
Соль	0,37	0,37	0,37
Препарат Biofos, 21%	1,7	1,6	1,4
Бикарбонат натрия	0,22	0,19	0,17
Витаминизированный премикс для домашней птицы Nutrablend	0,25	0,25	0,25
L-лизина гидрохлорид	0,33	0,30	0,17
L-метионин	0,13	0,15	0,28
L-треонин	0,04	0,05	0,07

^ψ Рационы гранулировали через головку диаметром 3 мм, охлаждали, измельчали и фасовали в бумажные мешки для хранения до момента кормления.

Начальный рацион удаляли из загон на 16-ый день исследования. Оставшийся корм взвешивали, удаляли из каждого питателя и помещали в пронумерованные бункеры, номер на которых соответствовал номеру загона. Питатели перезаполняли ростовым рационом. Этот процесс повторяли на 30-ый день исследования, на этот раз заменяли ростовой рацион на заключительный рацион. На 36-ой день эксперимент заканчивали и оставшийся заключительный рацион взвешивали и регистрировали для каждого загона.

Суммарное потребление корма на загон для каждой фазы (начальной, ростовой и заключительной) рассчитывали как: введенный корм - извлеченный корм.

Потребление корма одной птицей в сутки рассчитывали как: суммарное потребление корма - [суточная численность птиц в загоне x суммарное число дней кормления].

С. Масса птиц.

Массы загон регистрировали в конце каждого периода кормления (начального, ростового, заключительного). В конце начального периода (день 16) всех птиц в каждом загоне помещали в таз (50 см×35 см×40 см) и взвешивали. Массу таза вычитали из суммарной массы для определения массы птиц в загоне. В конце ростового периода (день 30) всех птиц в каждом загоне помещали в 2 таза с одинаковой массой (каждый 103 см×55 см×41 см), взвешивали, и массы складывали вместе. Массу каждого таза (определенную перед тем, как в него помещали птиц) вычитали из суммарной массы для определения массы птиц в загоне. В конце заключительного периода (день 36) всех птиц в каждом загоне помещали в 2 таза с одинаковой массой (каждый 103 см×55 см×41 см) и взвешивали. В этот раз, весы тарировали с помощью тазов на месте. Затем определяли массу птиц в каждом тазе для определения суммарной массы загона. Весы повторно тарировали между загонами для учета накопленных экскрементов. В каждом из периодов взвешивания, проводили также счет голов во время помещения птиц в тазы.

D. Методики отбора проб

Каждую неделю (дни 7, 14, 21, 28 и 35), от 1 до 3 птиц выбирали случайным образом из каждого загона и подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков. Содержимое слепых кишок (0,5 г) собирали и смешивали с деионизированной водой (2 мл) в скнтилляционном флаконе из полиэтилена высокой давления объемом 20 мл (Fisher Sci.; 03-337-23B), используя вортекс-миксер. Для определения величины pH использовали портативный pH-метр (Thermo Scientific Orion 3-star portable pH meter, Waltham, MA). Четыре части смеси из слепой кишки добавляли к одной части 25% в отношении веса к объему раствора метафосфорной кислоты и гомогенизировали с использованием вортекс-миксера. Образец затем переносили в 2 микроцентрифужных пробирки в аликвотах 1 мл и замораживали при -18°C и хранили до момента проведения анализа на летучие жирные кислоты (VFAs).

В дни 7 и 21, содержимое слепых кишок разделяли на 2 аликвоты. Одну аликвоту использовали для анализа на VFA, и приготавливали ее, как было объяснено выше. Другую аликвоту (0,5 г) помещали непосредственно в отдельный скнтилляционный флакон из полиэтилена высокой давления объемом 20 мл (Fisher Sci.; 03-337-23B) и замораживали (-80°C) для количественного определения числа бактерий, используя количественную ПЦР в режиме реального времени.

E. Анализ на величину pH в слепой кишке и на содержание летучих жирных кислот

Предварительно разбавленные и подкисленные образцы слепой кишки размораживали, гомогенизировали с помощью вортекс-миксера и центрифугировали при $24\times g$ в течение 18 мин. Водную надосадочную жидкость переносили во флаконы для газовой хроматографии. Летучие жирные кислоты количественно определяли на газовом хроматографе Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), оборудованном капиллярной колонкой DB-WAX (30 мм \times 0,53 мм \times 0,5 мм толщина пленки; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) и пламенно-ионизационным детектором. В качестве газа-носителя использовали гелий при расходе 22 см/с, с вводом 1 мкл пробы с делением потока 50:1. Начальная температура печи составляла 80°C , и температуру повышали с шагом $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 220°C . Отверстие для впуска и детектор имели температуру 250°C . Летучие жирные кислоты определяли количественно путем сравнения со смесью известных стандартов (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), содержащей ацетат, пропионат, изобутират, бутират, изовалерат, валерат, изокапроат, капроат и гептаноат.

F. Измерения тушек

Птиц забивали в возрасте 5 недель для определения массы тушек. Корм переставали давать приблизительно за 4 ч до забивания. Пять птиц среднего размера отбирали из каждого загона и помещали в ящики-ловушки для транспортировки в зону переработки. Пять птиц взвешивали из каждого загона для определения живой массы непосредственно перед забоем путем оглушения и обескровливания. Из птиц выпускали кровь в течение 2 мин и затем помещали в роторный шпарильный аппарат при 63°C приблизительно на 30 с. Птиц переносили в роторную барабанную механическую перооципывающую машину на 30 секунд для удаления перьев. Ноги, голову и лапы удаляли, и тушки потрошили через разрез около ануса. Тушки из каждого загона затем взвешивали для определения выхода парной тушки.

G. Статистический анализ

Данные анализировали с использованием смешанной процедуры из программного обеспечения SAS® Version 9.4. Модель включала фиксированное воздействие обработки, случайное воздействие блока и загона в качестве предмета исследования. Значимость заявляли при значении $P < 0,05$. Различия между средними значениями, полученными методом наименьших квадратов, определяли с использованием PDiff опции программного обеспечения SAS®.

H. Результаты.

Бройлеры характеризовались одинаковым потреблением корма, эффективностью использования кормов и средним суточным увеличением массы при всех обработках. На массу птиц и смертность обработка также не влияла. Однако, выход разделанных тушек был меньше для птиц, которые получали *M. elsdenii* путем введения через пероральный желудочный зонд по сравнению с выход разделанных тушек в случае контрольных птиц или птиц, которые получали *M. elsdenii* в форме нанесенного аэрозоля.

Величина pH в слепой кишке была меньше у птиц, которые получали *M. elsdenii* либо путем нанесения аэрозоля, либо путем перорального введения, по сравнению с величиной pH контрольных птиц ($P < 0,01$; табл. 11).

Таблица 11. Влияние *Megasphaera elsdenii* на величину pH и концентрации VFA в слепой кишке

Показатель*	День	Контроль ¹	Аэрозоль ²	Перорально ³	SEM	P-значение	
						Обработка [†]	Сравнение ^{††}
pH	7	6,87 ^A a	6,85 ^A ac	6,81 ^A a	0,103	T, D	0,01
	14	6,67 ^A b	6,25 ^B b	6,11 ^B b			
	21	6,15 ^A a	6,12 ^A b	6,25 ^A b			
	28	6,83 ^A ab	6,81 ^A a	6,67 ^A ac			
	35	7,26 ^A c	7,10 ^A c	7,15 ^A d			
Ацетат	7	53,53 ^A a	58,66 ^A a	58,42 ^A a	3,604	D, I	0,91
	14	61,79 ^A a	66,20 ^{AB} a	74,00 ^B b			
	21	61,48 ^A b	47,66 ^B b	46,4 ^B c			
	28	40,42 ^A bc	38,83 ^A b	42,36 ^A cd			
	35	39,13 ^A bc	41,83 ^A b	36,22 ^A d			
Пропионат	7	1,82 ^A a	1,48 ^A a	1,52 ^A a	0,608	D, I	0,51
	14	2,35 ^A ab	2,10 ^A a	2,69 ^A ab			
	21	6,36 ^A c	4,01 ^B b	3,63 ^B bc			
	28	3,73 ^A bd	4,08 ^A b	4,21 ^A c			
	35	4,58 ^A d	5,88 ^A c	5,96 ^A d			
Отношение ацетат: пропионат	7	31,96 ^A a	41,33 ^B a	42,03 ^B a	2,168	T, D, I	0,003
	14	29,80 ^A a	40,44 ^B a	33,69 ^A b			
	21	12,36 ^A c	13,62 ^A bcd	13,57 ^A c			
	28	13,25 ^A c	12,96 ^A cd	14,30 ^A c			
	35	9,81 ^A c	8,33 ^A d	7,80 ^A d			
Бутират	7	5,60 ^A a	5,54 ^A a	5,73 ^A a	1,094	D, I	0,73
	14	9,45 ^A b	10,95 ^{AB} b	13,40 ^B b			
	21	17,79 ^A c	11,77 ^B b	13,45 ^B b			
	28	6,67 ^A ab	7,02 ^A ac	7,35 ^A ac			
	35	8,15 ^A b	9,70 ^A ab	8,40 ^A ac			
Изобутират	7	0,39 ^A a	0,36 ^A a	0,34 ^A a	0,055	D	0,04
	14	0,37 ^A a	0,35 ^A a	0,45 ^A a			
	21	0,38 ^A a	0,17 ^B b	0,15 ^B b			

	28	0,05 ^A b	0,00 ^A c	0,00 ^A b			
	35	0,37 ^A a	0,37 ^A ad	0,34 ^A a			
Валерат	7	0,29 ^A a	0,31 ^A a	0,29 ^A a	0,078	D	0,89
	14	0,68 ^A bc	0,71 ^A b	0,90 ^B b			
	21	1,13 ^A c	0,91 ^B b	0,96 ^{AB} b			
	28	0,32 ^A ac	0,28 ^A c	0,34 ^A a			
	35	0,63 ^A b	0,79 ^A b	0,68 ^A c			
Изовалерат	7	0,317 ^A a	0,292 ^A a	0,314 ^A a	0,059	D	0,96
	14	0,375 ^A a	0,357 ^A ab	0,505 ^A b			
	21	0,419 ^A a	0,396 ^{AB} b	0,257 ^{AB} a			
	28	0,038 ^A b	0,040 ^A c	0,050 ^A c			
	35	0,325 ^A a	0,396 ^A ab	0,355 ^A ab			
Капроат	7	0,150 ^A a	0,168 ^A a	0,144 ^A a	0,020	T, D, I	0,13
	14	0,150 ^A a	0,161 ^A a	0,292 ^B b			
	21	0,000 ^A bc	0,000 ^A b	0,001 ^A c			
	28	0,000 ^A c	0,000 ^A b	0,001 ^A c			
	35	0,000 ^A c	0,000 ^A b	0,001 ^A c			
Изокапроат	7	0,125 ^A a	0,116 ^A a	0,142 ^A a	0,014	D	0,79
	14	0,085 ^A b	0,101 ^A a	0,078 ^A b			
	21	0,000 ^A c	0,001 ^A b	0,001 ^A c			
	28	0,000 ^A c	0,001 ^A b	0,001 ^A c			
	35	0,000 ^A c	0,001 ^A b	0,001 ^A c			
Гептаноат	7	0,177 ^A a	0,186 ^A a	0,146 ^A	0,023	D	0,88
	14	0,104 ^A b	0,082 ^B b	0,103 ^{AB}			
	21	0,000 ^A c	0,002 ^A c	0,003 ^A			
	28	0,000 ^A c	0,001 ^A c	0,003 ^A			
	35	0,000 ^A c	0,001 ^A c	0,053 ^A			
Суммарные VFA	7	62,40 ^A a	67,10 ^A a	67,01 ^A a	4,806	D, I	0,79
	14	75,34 ^A b	81,00 ^{AB} b	92,39 ^B b			
	21	87,57 ^A b	64,90 ^B a	64,82 ^B ad			
	28	51,23 ^A a	50,25 ^A c	54,29 ^A ac			
	35	53,18 ^A a	58,98 ^A c	51,97 ^A d			

* Концентрация VFA приводится в мМ.

¹ Контрольные птицы не имели контакта с *M. elsdenii*.

² Птицы, которые получали *M. elsdenii* в форме аэрозоля, нанесенного на поверхность их тела при дозе ~ 1,7 мл/птица.

³ Птицы получали 0,2 мл *M. elsdenii* через пероральный желудочный зонд.

[†] T=Влияние обработки; D=Влияние дня отбора пробы; I=Взаимосвязь между обработкой и днем отбора пробы; P<0,05.

^{††} Сравнение "*M. elsdenii* относительно контроля".

^{A, B} Средние значения в строке цифр без общих верхних индексов отличаются при P<0,05.

^{a, b} Средние значения в колонке цифр без общих верхних индексов отличаются при P<0,05.

Средние значения pH в слепой кишке для контрольной, аэрозольной и пероральной обработок составляли 6,76, 6, 63 и 6, 60, соответственно. Было выявлено влияние дня проведения обработки на концентрации в слепой кишке ацетата (P < 0,01), пропионата (P=0,03), бутирата (P < 0,01), на отношение ацетат: пропионат (P=0,01; отношение A:P), на концентрацию капроата (P=0,002) и на суммарную концентрацию VFA (P < 0,01) (табл. 4). Концентрация ацетата повышалась в период с 7 по 14 день, достигая максимума на день 14. Содержимое слепой кишки птиц, которые получали *M. elsdenii* через пероральный желудочный зонд, содержало более высокие концентрации ацетата, бутирата и капроата, чем в случае контрольных птиц на день 14 (P < 0,01). Ко дню 21, концентрация ацетата снижалась для всех случаев обработок; однако, концентрация ацетата в слепой кишке была выше у контрольных птиц по сравнению с птицами, подвергнутыми обработке аэрозолем или перорально (P < 0,01). Концентрации пропионата и бутирата были также выше в содержимом слепой кишки контрольных птиц по сравнению с пти-

цами, подвергнутыми обработке с помощью *M. elsdenii* на день 21 ($P < 0,01$). Концентрация пропионата достигала максимума на день 21 в случае всех обработок и оставалась повышенной вплоть до дня 35, но она не отличалась для всех обработок от дня 28 до дня 35 ($P > 0,05$). Отношение А:Р было выше в содержимом слепой кишки птиц, подвергнутых обработке с помощью *M. elsdenii* по сравнению с контрольными птицами на день 7 ($P < 0,01$), при этом отношение А:Р составляло 31,96, 41,33 и 42,03 для контроля, аэрозоля и перорального желудочного зонда, соответственно. На день 14, отношение А:Р в слепой кишке птиц, обработанных аэрозолем, содержащим *M. elsdenii* (40,44 мМ), было больше чем в случае контрольных птиц (29,80 мМ) или птиц, которые получали *M. elsdenii* через пероральный желудочный зонд (33,69; $P < 0,03$). Отношение А:Р в слепой кишке не отличалось для всех обработок на день от 21 до 35 ($P > 0,05$). На концентрации изобутирата, валерата, изовалерата, изокапроата и гептаноата в содержимом слепой кишки не влияла обработка ($P > 0,10$). Суммарная концентрация VFA была выше в случае птиц с пероральной обработкой по сравнению с контрольными птицами на день 14 ($P < 0,001$). Однако, суммарная концентрация VFA была ниже ($P < 0,05$) в содержимом слепой кишки птиц, которые получали *M. elsdenii* в форме аэрозоля или перорально (64,90 мМ и 64,82 мМ, соответственно) чем в случае контрольных птиц (87,57 мМ) на день 21. Суммарные концентрации VFA в слепой кишке были одинаковыми для все обработок для дней 7, 28 и 35 ($P > 0,30$).

Пример 9. Влияние *Megasphaera elsdenii* на показатель роста бройлерных цыплят

А. План эксперимента и обработок - исследование 1.

Проводили блочный эксперимент в плане с восемнадцатью репликами шести обработок, сгруппированный по группам и по ярусности клеток, с использованием самцов суточных бройлерных цыплят Cobb 500, возраст которых на момент начала обработки составлял одни сутки (Cobb-Vantress in Siloam Springs, Arkansas). Обработки представляли собой контрольную обработку (без пробиотика), Lactipro Advance® (нелиофилизированную жидкую культуру штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, MS Biotec, Wamego, Kansas), вводимую через пероральный желудочный зонд, культуру штамма *Megasphaera elsdenii* KS 249, вводимую через пероральный желудочный зонд, штамм *Megasphaera elsdenii* ATCC® 25940, вводимый через пероральный желудочный зонд, Lactipro Advance® (нелиофилизированную жидкую культуру штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 MS Biotec, Wamego, Kansas), наносимую на поверхность тела птиц в форме аэрозоля, и лиофилизированный штамм *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (MS Biotec, Wamego, Kansas). Птиц размещали в 108 загонах, и в каждом загоне содержалось 8 птиц на начало эксперимента (суммарно 1152 птицы).

Птиц разбивали на группы по 8 особей, и регистрировали массу каждой группы. Группы птиц обрабатывали поблочно, и экспериментальные обработки закрепляли случайным образом за загонами внутри каждого блока.

Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали пероральному дозированию (через желудочный зонд) в количестве 0,2 мл Lactipro Advance®, содержащей $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл нелиофилизированной жидкой культуры штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали пероральному дозированию (через желудочный зонд) в количестве 0,2 мл свежей культуры, содержащей неизвестную концентрацию штамма *Megasphaera elsdenii* KS 249. Попытки оценить КОЕ/мл для этого штамма были безуспешными. Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали пероральному дозированию (через желудочный зонд) в количестве 0,2 мл свежей культуры, содержащей $1,06 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *Megasphaera elsdenii* ATCC® 25940. Птиц, которых дозировали перорально, держали в ладонях лаборанты, клюв поддерживали открытым с помощью большого и указательного пальцев, и культуру выливали непосредственно в ротовую полость с помощью градуированной репипетер-пипетки Eppendorf® (Hamburg, Germany).

Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали нанесению аэрозоля 15 мл на загон Lactipro Advance®, содержащего $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (~1,88 мл/птица). Птиц помещали в пластмассовый таз (50 см длиной×35 см шириной×40 см глубиной), и культуру наносили на поверхность тела птиц в форме аэрозоля, используя пневматическое устройство для распыления, снабженное наконечником для распыления. Для минимизации перекрестной контаминации, с птицами, которым наносили аэрозоль, проводил манипуляции назначенный специально персонал, и этих птиц помещали в специально предназначенные устройства для транспортировки с целью взвешивания, нанесения аэрозоля и переноса в загон.

Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали введению подкормки (смеси рациона и лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*), содержащей $1,18 \times 10^7$ КОЕ/г штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, в количестве четверть чайной ложки на птицу. Обработку проводили непосредственно в желобковых кормушках каждый день в 13.00 ч, начиная со дня 10 исследования.

Остальные 18 загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) служили в качестве контроля и не имели контакта с пробиотическим продуктом. Для минимизации перекрестной контаминации с подвергаемыми обработке птицами, манипуляции с контрольными птицами проводил специально назначенный персонал, и этих птиц помещали в специально предназначенные устройства для транспортировки с целью взвешивания.

вания и переноса в загон.

В. План эксперимента и обработок - исследование 2

Проводили блочный эксперимент в плане с восемнадцатью репликами двух обработок, сгруппированный по группам и по ярности клеток, с использованием самцов суточных бройлерных цыплят Cobb 500 (Cobb-Vantress in Siloam Springs, Arkansas). Обработки представляли собой контрольную обработку (без пробиотика) или обработку лиофилизированным штаммом *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (MS Biotec, Wamego, Kansas). Птиц размещали в 108 загонах, и в каждом загоне содержалось 8 птиц на начало эксперимента (суммарно 1152 птицы).

Птиц разбивали на группы по 8 особей и регистрировали массу каждой группы. Птиц обрабатывали поблочно, и экспериментальные обработки закрепляли случайным образом за загонами внутри каждого блока. Восемнадцать загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) подвергали введению подкормки (смеси рациона и лиофилизированных клеток *Megasphaera elsdenii*), содержащей $1,18 \times 10^7$ КОЕ/г штамма *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, в количестве четверть чайной ложки на птицу. Обработку проводили непосредственно в желобковых кормушках каждый день в 13.00 ч, начиная со дня 10 исследования.

Остальные 18 загон (8 птиц/загон; суммарно 144 птицы) служили в качестве контроля и не имели контакта с пробиотическим продуктом. Для минимизации перекрестной контаминации с подвергаемыми обработке птицами, манипуляции с контрольными птицами проводил специально назначенный персонал, и этих птиц помещали в специально предназначенные устройства для транспортировки с целью взвешивания и переноса в загон.

С. Кормление и обеспечение водой - исследования 1 и 2

Свежей водой обеспечивали птиц без ограничения. Перед размещением птиц в загон, 9,5 кг общего начального рациона (табл. 12) помещали в желобковые кормушки вдоль каждого загон.

Таблица 12. Композиция экспериментально рациона [†]

Ингредиент	
Мука из зерновых культур	55,26
Мука из лущеных бобов сои (47% СР)	37,15
Соевое масло	3,10
Измельченный известняк	1,45
Препарат Biofos, 21%	1,70
Соль	0,37
Бикарбонат натрия	0,22
Витаминизированный премикс для домашней птицы	0,25
L-лизина гидрохлорид	0,33
L-метионин	0,13
L-треонин	0,04

[†] Рационы гранулировали через головку диаметром 3 мм, охлаждали и измельчали.

Корм добавляли по мере необходимости для обеспечения неограниченного доступа на протяжении всего исследования. После окончания эксперимента (день 18), не потребленный корм удаляли из каждой кормушки, взвешивали и регистрировали. Суммарное потребление корма на загон рассчитывали по разнице между количествами, введенными и удаленными из кормушек. Потребление корма одной птицей в сутки рассчитывали как: суммарное потребление корма - [суточная численность птиц в загон x суммарное число дней кормления].

Д. Масса птиц - исследования 1 и 2

По завершению исследования, всех птиц в загон помещали в таз (50 см длиной×35 см шириной×40 см глубиной) и взвешивали. Массу таза определяли до помещения в него птиц, и массу таза вычитали из суммарной массы для определения массы птиц в загон. Одновременно, проводили также счет голов птиц.

Е. Статистический анализ - исследования 1 и 2

Данные анализировали с использованием смешанной процедуры из программного обеспечения SAS® Version 9.4. Модель включала фиксированное воздействие обработки, случайное воздействие блока и загон в качестве предмета исследования. Значимость заявляли при значении $P < 0,05$. Различия между средними значениями, полученными методом наименьших квадратов, определяли с использованием PDiff опции программного обеспечения SAS®.

Ф. Результаты - исследования 1 и 2

В случае исследования 1 бройлеры во всех группах обработки характеризовались одинаковым суточным потреблением корма, средним суточным увеличением массы, отношением прибавка массы:корм и показателем смертности.

Однако, как показано в табл. 13, в исследовании 2 было обнаружено, что среднее суточное увеличе-

ние массы ($P=0,02$) и отношение прибавка массы:корм ($P=0,04$), оба эти показателя были выше у птиц, получающих лиофилизированные клетки *Megasphaera elsdenii*, по сравнению с контрольными птицами. Смотрите также фиг. 21, на которой приведены данные по отношению корм:прибавка массы. Потребление корма и показатель смертности не отличались между группами обработки.

Таблица 13. Влияние *Megasphaera elsdenii* на продуктивность бройлеров (исследование 2)

Показатель	Контроль [†]	Лиофилизированный продукт ^{††}	SEM ²	P-значение ^{†††}
Количество загонов	18	18	-	-
ADG ¹ , грамм	27,6 ^a	29,0 ^b	0,43	0,02
Потребление корма, грамм/сутки	36,2	36,5	0,54	0,70
Прибавка массы:корм	0,76 ^a	0,80 ^b	0,01	0,04
Показатель смертности	2,08	0,69	0,93	0,31

¹ Средний суточный прирост массы.

² Стандартная ошибка среднего.

[†] Контрольная обработка, без пробиотика.

^{††} Лиофилизированные клетки *Megasphaera elsdenii* вводили ежедневно в форме подкормки.

^{†††} P-значение для полной модели с критерием Фишера.

^{a, b} Средние значения в строке цифр без общих верхних индексов отличаются при $P<0,05$.

Пример 10. Влияние *Megasphaera elsdenii* на ферментацию в слепой кишке лошади

А. План эксперимента и обработки

Восемь скакунов, 4 кобылы и 4 мерина (средняя масса тела=540 кг; SEM=75 кг), предварительно оснащенные катетером для исследования слепой кишки (Beard et al., JAS 89(8): 2425-2429 (2011)), использовали в планируемом эксперименте с 3×3 (обработка × лошадь) неполным латинским квадратов, реплицированным в течение 3 периодов обработки. Каждый период обработки разделяли периодом выведения препарата из организма в течение 28 дней. Обработки представляли собой (1) негативный контроль (в отсутствие *M. elsdenii*; контроль), (2) 50 мл свежей культуры, содержащей $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125 (Lactipro Advance®, MS Biotec, Wamego, Kansas), вводимых перорально в форме киселя (кисель), и (3) 0,40 г лиофилизированной культуры, содержащей $7,02 \times 10^8$ КОЕ/мл штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125 (MS Biotec, Wamego, Kansas), вводимой в форме 2 лакомств на основе из мелассы (лиофилизированный). Лошадей распределяли случайным образом по типу обработки (табл. 14).

Таблица 14. Распределение обработок

Идентификационный номер лошади	Период 1 обработки	Период 2 обработки	Период 3 обработки
0	Лиофилизированный ³	Контроль ¹	Кисель ²
1	Контроль	Кисель	Лиофилизированный
2	Кисель	Лиофилизированный	Контроль
3	Контроль	Кисель	Лиофилизированный
4	Кисель	Контроль	Лиофилизированный
6	Кисель	Лиофилизированный	Контроль
7	Лиофилизированный	Кисель	Контроль
10	Лиофилизированный	Контроль	Кисель

¹ Контроль - не обрабатывали с помощью клеток *M. elsdenii*.

² Кисель - лошади получали 50 мл *M. elsdenii* через пероральный желудочный зонд ($1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл) в начале каждого периода обработки.

³ Лиофилизированный - лошади получали *M. elsdenii* ежедневно в форме лиофилизированного порошка со средним содержанием $7,02 \times 10^8$ КОЕ/мл внутри 2 лакомств на основе из мелассы.

Лошадей размещали в индивидуальных стойлах (3,05×3,66 м) внутри одной конюшни, и выстилали пол сосновой стружкой. Лошадей случайным образом распределяли по разным стойлам для каждого периода обработки, для того чтобы учитывать любые возможные изменения вентиляции или температуры, связанные с расположением стойла. Лошадей ежедневно выводили на прогулку для получения физической нагрузки в течение периодов обработки.

Лошадей, получающих пероральный кисель, дозировали непосредственно перед кормлением в первый день каждого периода обработки путем введения 50 мл свежей культуры, содержащей $1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл штамма *M. elsdenii* NCIMB 41125, используя ручное дозирующее устройство (настраиваемый автоматический прибор для вливания лекарства в ротовую полость животного объемом 60 мл МКШ, NJ Phillips, NSW, Australia). Перед введением культуры пробиотика, пакет с 5 л свежей культуры интенсивно перемешивали до гомогенизации содержимого. Ручное дозирующее устройство соединяли с пакетом с помощью трубки Tucon, и заполняли резервуар. Приблизительно от 100 до 200 мл культуры сбрасывали в контейнер для отходов для гарантии того, что в трубке и в устройстве не присутствует кислород.

Лошади в группе обработки лиофилизированным пробиотиком получали 2 лакомства на основе зерна и мелассы, содержащие лиофилизированный продукт, перед утренним кормлением каждый день. Штамм *M. elsdenii* NCIMB 41125 лиофилизировали заранее перед исследованием и расфасовывали в герметизированные в вакууме упаковки, каждая из которых содержала приблизительно 0,40 г лиофилизированных бактерий со средним количеством $7,02 \times 10^8$ КОЕ/мл *M. elsdenii*. Один образец высевали каждый день, для того чтобы удостовериться в жизнеспособности бактерий на протяжении каждого периода обработки. Если лошадь отказывалась подвергаться обработке, лиофилизированные продукт вводили рукой в форме болуса.

Остальных лошадей не подвергали воздействию пробиотика во время периода, в который они выполняли роль контрольных животных.

В. Кормление и обеспечение водой

Во время периодов обработки, лошадей кормили два раза в день, при этом сено и концентрат разделяли поровну на два кормления. Каждой лошади давали корм в количестве от 1% ее массы тела с учетом содержащегося в корме влаги в форме сена костера в сутки (табл. 15).

Таблица 15. Анализ питательных веществ в рационе

Компоненты в расчете на сухое вещество (DM), %	Сено костера 1 ^a	Сено костера 2 ^b	Концентрат ^c
DM	90,5	92	87,9
Сырой белок (CP)	8,2	8,4	14,5
Кислотно-детергентная клетчатка (ADF)	39,2	42,2	8,1
Нейтрально-детергентная клетчатка с применением амилазы (aNDF)	63,9	68,9	15,8
Сырой жир	2,5	2,1	--
Крахмал	1,6	0,8	--
Зола	7,27	6,93	--
Переваримая энергия (DE) Мкал/кг	2,05	0,87	1,6
Кальций	0,38	0,3	0,87
Фосфор	0,15	0,22	0,74
Магний	0,17	0,16	0,17
Калий	1,50	1,74	0,88

^a Скармливают в количестве 1% от массы тела с учетом содержащейся влаги в сутки во время периодов обработки.

^b Скармливают без ограничения во время периода выведения препарата.

^c Скармливают возрастающие количества от 0,2% от массы тела с учетом содержания влаги/сутки до максимально 1% массы тела с учетом содержания влаги во время периодов обработки.

Каждой лошади увеличивали питание до 1% от ее массы тела путем введения текстурированного концентрата (анализ приведен в табл. 15 выше, а композиция приведена в табл. 16 ниже) в количестве 0,2% от массы ее тела в сутки в период с 1-го по 5-ый день и затем поддерживали на уровне 1% BW AF в зерне с 5-го по 7-ой день. Все отказы взвешивали и регистрировали. Стойла были оборудованы автоматическими поилками для неограниченного обеспечения свежей водой. Поилки очищали и проверяли на исправность несколько раз в день.

Таблица 16. Композиция используемого в эксперименте концентрата ^a

Ингредиент рациона	Уровень введения, %
Верно	20,00
Овес	61,67
Меласса	10,00
Соевая мука, 48%	5,22
Известняк	1,25%
Соль	0,50%
Монокальция фосфат	1,02%
Витамин А 30000	0,01%
Витамин Д 30000	0,00%
Витамин Е 20000	0,25%
Сu сульфат	0,01%
Zn оксид	0,01%
Na селенит	0,06%

^a Скармливают во время периодов обработки в возрастающих количествах от 0,2% от массы тела с учетом содержания влаги в сутки до максимально 1% от массы тела с учетом содержания влаги.

Во время периодов выведения препарата из организма, лошадей размещали в сухом стойле и содержали на неограниченном рационе, состоящем из сена из костера (таблица **). Лошадей взвешивали по окончании каждого периода выведения препарата из организма для обеспечения точности расчета количества корма, вводимого в периоды обработок.

С. Методика отбора образцов

Образцы содержимого слепой кишки собирали через катетер каждые 4 ч во время каждого 7-дневного периода обработки. Лошадей кормили в 10.00 часов и в 22.00 часа каждый день, и образцы собирали через 4, 8 и 12 ч после кормления перед следующим кормлением. В день 0 каждого периода обработки, образцы собирали перед дозированием или кормлением для определения исходных значений pH, концентраций VFA и численности популяций *M. elsdenii* в задней кишке.

Образцы собирали путем удаления крышек с катетеров и улавливания содержимого слепой кишки по мере вытекания его из катетера. Жидкость из слепой кишки процеживали через четыре слоя суровой марли и затем помещали в чашку для образцов объемом 100 мл. Если самотеком не удавалось собрать достаточного количества образца, то для извлечения содержимого слепой кишки использовали ручной насос. В 10.00 ч в дни 0, 1, 3 и 7, собирали дополнительные образцы содержимого слепой кишки для анализа методом полимеразной цепной реакции (PCR). Во время первого периода обработки, нефилтрованные образцы собирали в сцинтилляционные флаконы из полиэтилен высокой плотности объемом 20 мл (Fischer Sci.; 03-337-23B) Эти нефилтрованные образцы давали возможность отделить образцы для выделения ДНК, поэтому, для остальных 2 периодов обработок, процеженную жидкость из слепой кишки собирали в конические центрифужные пробирки Falcon объемом 50 мл (Corning Inc. 352070; Corning, NY) и немедленно замораживали при -80°C до их использования в анализе методом PCR. Лаборанты меняли перчатки после манипуляций с каждой лошастью.

Д. Анализ величины pH и концентрации летучих жирных кислот в слепой кишке

Величину pH процеженной жидкости из прямой кишки измеряли сразу после ее сбора, используя портативный pH-метр (Thermo Scientific Orion 3 Star Portable pH Meter, Waltham, MA; электрод Accumet). После регистрации величины pH, аликвоты образца объемом 1 мл переносили в 2 микроцентрифужных пробирки и смешивали с 0,25 мл 25% метафосфорной кислоты для депротенизации. Образцы замораживали при -18°C в течение по меньшей мере 24 ч перед проведением анализа на концентрацию VFA.

Подкисленные и замороженные образцы из слепой кишки размораживали и гомогенизировали с помощью вортекс-миксера и центрифугировали при 24×g в течение 18 мин. Водную надосадочную жидкость затем переносили во флаконы для газовой хроматографии. Летучие жирные кислоты количественно определяли на газовом хроматографе Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), оборудованном капиллярной колонкой DB-WAX (10 мм×0,10 мм×0,1 мм толщина пленки; columns Agilent и J&W, Santa Clara, CA) и пламенно-ионизационным детектором. В качестве газа-носителя использовали водород при расходе 46 см/с, с вводом 1 мкл пробы с делением потока 50:1. Начальная температура печи составляла 70°C, и температуру повышали с шагом 15°C/мин до 130°C, затем повышали с шагом 60°C/мин до 220°C и выдерживали в течении 2 мин. Отверстие для впуска и детектор имели температуру 260 и 300°C соответственно. Летучие жирные кислоты определяли количественно путем сравнения со смесью известных стандартов (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), содержащей ацетат, пропионат, изобутират, бутират, изовалерат, валерат, изокапроат, капроат и гептаноат.

Е. Статистический анализ

Данные анализировали с использованием процедуры Glimmix из программного обеспечения SAS®

Version 9.4. Модель включала фиксированное воздействие обработки и случайные воздействия лошади, периода и обработки во взаимосвязи с периодом. Лошадь служила в качестве предмета исследования. Проведение обработки в определенный час дня не являлась значимой для любого параметра и, по этому, исключалось из модели. Значимость заявляли при значении $P < 0,05$, и считали, что тенденция характеризуется значением $0,05 < P < 0,10$. Различия между средними значениями, полученными методом наименьших квадратов, определяли с использованием PDiff опции программного обеспечения SAS®.

Ф. Результаты

Значение рН в слепой кишке имело тенденцию составлять более высокую величину у лошадей, обработанных с помощью *M. elsdenii*, по сравнению с контрольными лошадьми, по мере увеличения добавки зерна в рационе. Смотрите фиг. 22. Значение рН в слепой кишке лошадей, которым вводили *M. elsdenii* в форме перорального киселя, было выше, чем у контрольных лошадей, на день 5 (7,00 и 7,19 соответственно; $P=0,09$), то есть в первый день, в который вводили полную порцию зерна. На день 7 у лошадей, получающих *M. elsdenii* в форме лиофилизированного лакомства, проявлялась тенденция иметь более высокое значение рН в слепой кишке (7,19), чем у контрольных лошадей (6,99; $P=0,09$).

В табл. 17 представлены данные по профилю летучих жирных кислот (VFA) в группах, подвергавшихся обработкам.

Таблица 17. Влияние *M. elsdenii* на профиль VFA в слепой кишке лошадей

Показатель*	День	Контроль ¹	Кисель ²	Лиофилизированный ³	SEM	P-значение	
						Обработка [†]	Сравнение ^{††}
Ацетат	0	47,02 ^{A, a}	43,03 ^{A, ab}	45,73 ^{A, a}	5,928	D	0,55
	5	43,72 ^{A, a}	40,88 ^{A, b}	40,08 ^{A, a}			
	6	39,41 ^{A, b}	38,53 ^{A, ab}	35,54 ^{A, b}			
	7	38,36 ^{A, b}	36,63 ^{A, a}	36,39 ^{A, b}			
Пропионат	0	14,86 ^{A, a}	14,12 ^{A, a}	15,81 ^{A, a}	3,078	D	0,54
	5	19,22 ^{A, ab}	18,80 ^{A, bc}	18,25 ^{A, b}			
	6	17,84 ^{A, abc}	17,67 ^{A, c}	15,08 ^{A, c}			
	7	16,78 ^{A, c}	15,24 ^{A, d}	14,54 ^{A, e}			
Отношение ацетат: пропионат	0	3,50 ^{A, a}	3,36 ^{A, a}	3,47 ^{A, a}	0,252	D	0,55
	5	2,37 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}			
	6	2,33 ^{A, b}	2,29 ^{A, b}	2,46 ^{A, b}			
	7	2,41 ^{A, b}	2,60 ^{A, c}	2,83 ^{B, c}			
Бутират	0	5,10 ^{A, a}	4,26 ^{A, ab}	4,58 ^{A, ab}	0,900	D	0,45
	5	4,70 ^{A, a}	4,18 ^{A, a}	4,22 ^{A, b}			
	6	4,15 ^{A, a}	3,67 ^{A, ab}	3,81 ^{A, ab}			
	7	3,53 ^{A, b}	3,36 ^{A, b}	3,57 ^{A, a}			
Изобутират	0	-0,01 ^{A, a}	-0,01 ^{AB, ab}	0,12 ^{B, a}	0,051	I	0,25
	5	0,01 ^{A, a}	0,02 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}			
	6	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, ab}	0,03 ^{A, b}			
	7	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, a}	0,04 ^{A, b}			
Валерат	0	0,16 ^{A, a}	0,04 ^{A, a}	0,10 ^{A, ab}	0,096	I	0,31
	5	0,14 ^{A, a}	0,05 ^{B, a}	0,08 ^{A, b}			
	6	0,12 ^{A, a}	0,07 ^{A, a}	0,13 ^{A, ab}			
	7	0,04 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}	0,15 ^{B, a}			
Капроат	0	0,000	0,000	0,007	0,012	--	0,57
	5	0,000	0,000	0,000			
	6	0,000	0,000	0,007			
	7	0,000	0,000	0,015			
Суммарно VFA	0	67,14 ^{A, ab}	61,46 ^{A, ab}	66,44 ^{A, a}	9,487	D	0,54
	5	67,82 ^{A, b}	63,97 ^{A, b}	62,73 ^{A, a}			
	6	61,53 ^{A, a}	60,06 ^{A, ab}	54,60 ^{A, b}			
	7	58,73 ^{A, a}	55,43 ^{A, a}	54,69 ^{A, b}			

* Концентрация VFA приведена в мМ.

¹ Контроль - без обработки с помощью *M. elsdenii*.

² Кисель - лошади получали 50 мл *M. elsdenii* через пероральный желудочный зонд ($1,97 \times 10^9$ КОЕ/мл) а начале каждого периода обработки.

³ Лиофилизированный - лошади получали *M. elsdenii* ежедневно в форме лиофилизированного порошка со средним содержанием $7,02 \times 10^8$ КОЕ/мл в двух 2 лакомствах на основе мелассы.

[†] T=Влияние обработки; D=Влияние дня отбора пробы; I=взаимосвязь между обработкой и днем отбора пробы; P<0,05.

^{††} Сравнение "*M. elsdenii* с контролем".

^{A, B} Средние значения в строке цифр без общих верхних индексов отличаются при P<0,05.

^{a, b} Средние значения в столбце цифр без общих верхних индексов отличаются при P<0,05.

Добавка *M. elsdenii* не влияла на концентрации ацетата или пропионата в слепой кишке (P>0,10; Table 17). Однако, была обнаружена связь дня проведения Отношение A:P в слепой кишке составляла большую величину на день 7 у лошадей, которые получали лиофилизированные *M. elsdenii* (2,83), чем у лошадей, которые не получали *M. elsdenii* (2,41) или которые получали *M. elsdenii* в форме перорального киселя (2,60; P<0,05).

Содержание валерата в слепой кишке было выше на день 7 у лошадей, которые получали лиофилизированные *M. elsdenii* (0,15 мМ), чем у контрольных животных (0,04 мМ) или у животных, которые получали пероральный кисель из *M. elsdenii* (0,07 мМ; P<0,02). Содержание валерата в слепой кишке составляло меньшую величину у лошадей, которым вводили пероральный кисель, на день 5, чем у контрольных животных (P<0,01); однако, оно было таким же, как у лошадей, обработанных лиофилизированными клетками *M. elsdenii* (P>0,10). Концентрации гептаноата и изокапроата были пренебрежительно низкими, и влияния на них обработки или взаимосвязи не обнаруживали, поэтому, данные для этих VFAs были исключены из табл. 17.

На величину рН в слепой кишке и на продукты ферментации оказывало наиболее сильное влияние добавка *M. elsdenii* в период от дня 5 до дня 7, то есть в те дни, в которые поглощалось максимальное количество зерна.

Пример 11. Оценка нанесения жидкой культуры *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (Lactipro®) на бройлерных цыплят

Экспериментальное исследование продуктивности бройлеров проводилось в научно-исследовательской корпорации Virginia Diversified Research Corporation с целью оценки влияния клеток *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, наносимых в форме аэрозоля или вводимых перорально, на показатель роста бройлерных цыплят.

Суточных бройлерных цыплят (n=720), вакцинированных путем распыления вакцины Coccivac-B в день 0, случайным образом распределяли на 6 различных групп обработки: (1) группу негативного контроля, не получающую *Megasphaera* (nCON), (2) группу аэрозоля, получающую *M. elsdenii* NCIMB 41125 в день 0 путем нанесения аэрозоля (1-2 мл/птица) при нахождении их в инкубаторах (d0 Mist), (3) группу зондового введения на день 7, получающую 2 мл *M. elsdenii* NCIMB 41125 в день 7 путем перорального введения через желудочный зонд после 2 ч воздержания от пищи и после 1 ч воздержания от воды (d7 GAV), (4) группу зондового введения в день 14, получающую 5 мл *M. elsdenii* NCIMB 41125 в день 14 путем перорального введения через желудочный зонд после 2 ч воздержания от пищи и после 1 часа воздержания от воды (d14 GAV), (5) группу зондового введения в день 21, получающую 10 мл *M. elsdenii* NCIMB 41125 в день 21 путем перорального введения через желудочный зонд после 2 ч воздержания от пищи и после 1 ч воздержания от воды (d21 GAV) и 6) группу положительного контроля (pCON), не получающую *Megasphaera*, но получающую начальный и ростовой корма, обработанные бацитрацин метиленовым дисалицилатом BMD (50 г/т) и заключительный корм, обработанный Stafac (20 г/т).

Каждая обработка была представлена 4 клетками, содержащими по 30 птиц в каждой. Рационы, которые обеспечивали птицам, были следующими: начальный корм в период 0-18 дней, ростовой корм в период 18-35 дней, и заключительный корм в период 35-39 дней. Массы тела животных, потребление корма и превращение корма регистрировали на протяжении всего 39-дневного периода исследования.

Таблица 18. Продуктивность бройлеров, оцененная после 25 и 39 дней кормления

	nCON	pCON	d0 Mist	d7 GAV	d14 GAV	d21 GAV
Живая масса на 25 день, кг	1,038 ^a	1,038 ^a	1,015 ^{ab}	0,980 ^b	1,003 ^{ab}	0,992 ^b
Затрата корма на единицу продукции (FCR), дни 1-25	1,531 ^a	1,516 ^a	1,430 ^b	1,555 ^a	1,531 ^a	1,571 ^a
Смертность на 25 день, %	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,83 ^{ab}	0,00 ^a	1,67 ^b
Живая масса на 39 день, кг	1,892 ^a	2,313 ^a	2,216 ^a	2,214 ^a	2,323 ^a	2,226 ^a
Затрата корма на единицу продукции (FCR), дни 1-39	1,814 ^b	1,754 ^{ab}	1,739 ^{ab}	1,771 ^{ab}	1,715 ^{ab}	1,674 ^a
Смертность на 39 день, %	0,017 ^a	0,00 ^a	0,83 ^a	1,67 ^a	1,67 ^a	3,33 ^a

^{a, b} Средние значения в строке цифр с различными верхними индексами отличаются при $P < 0,05$.

Результаты представлены в табл. 18. Общая смертность не различалась для всех видов обработок (табл. 18). Превращение корма для группы d0 Mist было значимо ниже, чем для всех других видов обработок на день 25, при этом показатель для группы pCON был выше на 5,3%, а для группы nCON выше на 6,5%. После 39 дней кормления, превращение корма в обработанных с помощью *Megasphaera elsdenii* группах значимо не отличалось от pCON, но имело тенденцию быть численно меньшим, за исключением группы d7 GAV. Превращение корма для группы d21 GAV было значимо более низким, чем для группы nCON, в которой этот показатель был на 7,7% выше.

Пример 12. Выращивание различных штаммов *M. elsdenii* на полуопределенных питательных средах, дополненных двумя источниками углерода

А. План эксперимента

В этом примере использовали следующие штаммы бактерий: (1) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, (2) *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940, (3) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702261, (4) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702262 и (5) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410.

Все штаммы выращивали в бутылках для сыворотки на полуопределенной лактатной питательной среде. Полученные культуры затем использовали для инокуляции 96-луночных планшетов, содержащих полуопределенную питательную среду, дополненную двумя источниками углерода: Na-лактатом и глюкозой, состоящую из 60% лактата и 40% глюкозы, 70% лактата и 30% глюкозы или 40% лактата и 60% глюкозы.

96-луночные планшеты затем инкубировали при 39°C в анаэробных условиях, и автоматически регистрировали оптическую плотность (600 нм) с интервалами 15 мин.

В. Анализ характеристик роста штаммов *M. elsdenii* на различных средах с двумя источниками углерода

Для сравнения характеристик роста, были построены кривые роста для различных полуопределенных сред и с различными штаммами *M. elsdenii*, при этом на x-оси было отложено время инкубации, а на y-оси регистрируемая оптическая плотность (фиг. 23-25).

Все штаммы *M. elsdenii*, подвергаемые испытанию в этом эксперименте, характеризовались аналогичными характеристиками роста при выращивании на полуопределенных средах, состоящих из 60% лактата и 40% глюкозы, 70% лактата и 30% глюкозы или 40% лактата и 60% глюкозы.

Пример 13. Выращивание различных штаммов *M. elsdenii* на полуопределенных питательных средах, дополненных двумя источниками углерода с последующей лиофилизацией клеток

А. План эксперимента

В этом примере использовали следующие штаммы бактерий: (1) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, (2) *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940, (3) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702261, (4) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702262 и (5) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410.

Все штаммы выращивали в бутылках для сыворотки на полуопределенной лактатной питательной среде. Полученные культуры затем использовали для инокуляции ферментаторов объемом 5 л, содержащих полуопределенную питательную среду, дополненную двумя источниками углерода: Na-лактатом и глюкозой, состоящую из 60% лактата и 40% глюкозы или 70% лактата и 30% глюкозы.

Образцы культур собирали после 8, 10, 12, 14 и 16 ч выращивания, охлаждали до комнатной температуры, и клетки асептически и анаэробно собирали путем удаления 99% жидкости. Ретентаты смешивали с раствором криопротектора (сахарозы) при соотношении 1/5 в асептических и анаэробных условиях, с получением конечной концентрации сахарозы 5% в отношении веса к объему. Отбирали образцы смеси для определения концентрации клеток *M. elsdenii* перед лиофилизацией (то есть, рассчитывали жизнеспособность клеток).

Аликвоты полученной смеси переносили во флаконы объемом 10 мл (4 мл/флакон) и быстро замораживали в жидком азоте. Флаконы переносили в лиофилизатор для лиофилизации в режиме быстрого цикла. После завершения лиофилизации, определяли количество живых бактерий путем ресуспендирования лиофилизированного продукта в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, проведения регидратации продукта в течение 40 мин при комнатной температуре и затем высевания на полуопределенной лактатной агаровой среде (то есть, рассчитывали жизнеспособность клеток).

Подсчитывали потери клеток путем вычитания концентрации клеток *M. elsdenii*, восстановленных после лиофилизации, из начальной (до лиофилизации) концентрации клеток *M. elsdenii*.

В. Сравнение потери клеток после лиофилизации различных штаммов *M. elsdenii*, выращенных на различных полуопределенных средах, собранных и лиофилизированных в различные моменты времени в процессе роста.

Все штаммы клеток *M. elsdenii*, испытанные в этом эксперименте, после лиофилизации давали жизнеспособные клетки. Приемлемое предельное значение потери клеток устанавливали равным 1,6 log КОЕ/мл. Потери клеток, обнаруживаемые в процессе лиофилизации клеток, выращенных на полуопределенных средах, содержащих 70% лактата и 30% глюкозы (табл. 19), вне зависимости от штамма или времени сбора, все имели величину ниже приемлемого предельного значения в диапазоне от 0,3 до 1,3 log.

Таблица 19. Потери клеток (log КОЕ/мл), наблюдаемые после лиофилизации штаммов клеток *M. Elsdenii*, выращенных на полуопределенных средах, состоящих из 70% лактата и 30% глюкозы, собранных и лиофилизированных после 8, 10, 12, 14 или 16 ч инкубации

Штамм	Время сбора, часы				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	–	0,41	0,46	0,60	0,42
ATCC 25940	0,61	0,56	0,64	0,80	0,61
NCIMB 702261	0,76	0,85	1,09	0,81	1,29
NCIMB 702262	0,65	0,98	1,01	0,96	0,99
NCIMB 702410	0,81	0,83	1,00	1,02	1,20

Потери клеток, обнаруживаемые в процессе лиофилизации клеток, выращенных на полуопределенных средах, содержащих 60% лактата и 40% глюкозы (табл. 20), были подвержены влиянию времени сбора в большей степени, но все штаммы все же имели величину потери клеток ниже приемлемого предельного значения для по меньшей мере трех времен сбора. Оптимизация времени сбора перед лиофилизацией может давать в результате дополнительное улучшение извлечения клеток после лиофилизации.

Таблица 20. Потери клеток (log КОЕ/мл), наблюдаемые после лиофилизации штаммов клеток *M. Elsdenii*, выращенных на полуопределенных средах, состоящих из 60% лактата и 40% глюкозы, собранных и лиофилизированных после 8, 10, 12, 14 или 16 ч инкубации

Штамм	Время сбора, часы				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	0,34	0,28	0,34	0,37	0,33
ATCC 25940	0,72	1,46	2,01	1,80	1,47
NCIMB 02261	0,74	1,26	1,28	1,48	1,45
NCIMB 02262	0,58	1,19	1,74	1,32	1,80
NCIMB 02410	–	0,70	1,12	1,37	1,19

В целом, описанный в изобретении способ позволял получать лиофилизированный продукт, содержащий жизнеспособные клетки, вне зависимости от используемого штамма *Megasphaera elsdenii*.

Пример 14. Инкапсулирование лиофилизированных клеток *M. elsdenii* и определение их стабильности

Ретентаты клеток *M. elsdenii* NCIMB 41125, полученные методом TFF, асептически смешивали с раствором криопротектора (сахарозы) в соотношении 1/5 с получением конечной концентрации сахарозы 5% (в отношении веса к объему). Смесь быстро замораживали в жидком азоте и переносили в лиофилизатор для лиофилизации с использованием быстрого цикла. После завершения лиофилизации, определяли количество живых бактерий путем ресуспендирования лиофилизированного продукта в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, проведения регидратации продукта в течение 40 мин при комнатной температуре и затем высевания на полуопределенной лактатной агаровой среде.

Полученный порошок лиофилизированных клеток *M. elsdenii* затем смешивали с носителем (объе-

мообразующим средством) и инкапсулировали путем распределения порошка в нагретом дистилляте пальмового масла или в стеариновой кислоте. Смесь затем быстро охлаждали, и отбирали образцы полученного продукта для определения выживаемости бактерий. Образцы ресуспендировали в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, смешивали в течение 15 с и регидратировали в течение 40 мин при комнатной температуре перед высеванием на полуопределенной лактатной агаровой среде. Этот эксперимент повторяли три раза, используя различные температуры нагревания и различный тип масла (метод 1, 2 и 3). В методе 1 используется температура нагревания 110°C и дистиллят пальмового масла в качестве инкапсулирующего материала. В методе 2 используется температура нагревания 52°C и смесь моно- и диглицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в качестве инкапсулирующего материала. В методе 3 используется температура нагревания 65°C и смесь моно- и диглицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в качестве инкапсулирующего материала.

Процент потерь рассчитывали путем вычитания концентрации клеток *M. elsdenii*, извлеченных после инкапсулирования, из концентрации клеток, восстановленных после лиофилизации, и деления полученной разницы на концентрацию клеток, восстановленных после лиофилизации.

Собирали дополнительные образцы продукта, инкапсулированного с использованием метода 2 и метода 3, и хранили их при комнатной температуре в аэробных условиях в течение 4 месяцев для оценки стабильности продукта. Образцы ресуспендировали в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, смешивали в течение 15 с и регидратировали в течение 40 мин при комнатной температуре перед высеванием на полуопределенной лактатной агаровой среде. На фиг. 26 и 27 показано, что стабильность лиофилизированных клеток *M. Elsdenii*, инкапсулированных методом 2 или 3, характеризуется потерей клеток приблизительно только на 1 log КОЕ/г.

Таблица 21. Процент потерь клеток, наблюдаемый после инкапсулирования лиофилизированных клеток *M. elsdenii* методом 1, 2 или 3

	Процент потерь клеток в результате инкапсулирования
Метод 1	83,4%
Метод 2	24,5%
Метод 3	32,1%

Методы 2 и 3, используемые для инкапсулирования лиофилизированных клеток *M. elsdenii*, давали в результате величину извлечения клеток выше, чем 67,9% (табл. 21).

Кроме того, лиофилизированные образцы, инкапсулированные методом 2 или методом 3, характеризовались величиной снижения жизнеспособности клеток на 1 log в процессе хранения при комнатной температуре в условиях нормального содержания кислорода и нормальной влажности в течение вплоть до 4 месяцев.

Инкапсулирование лиофилизированных клеток *M. elsdenii* методом 2 и 3 обеспечивало дополнительную защиту бактериям от воздействия кислорода и влажности. Этот метод позволял хранить инкапсулированные лиофилизированные клетки *M. elsdenii* при комнатной температуре без какой-либо специальной упаковки и добавлять этот продукт в корм.

Пример 15. Срок годности лиофилизированных клеток *M. elsdenii*, полученных на полупромышленной установке.

А. План эксперимента

Для выращивания клеток *M. elsdenii* NCIMB 41125A в этом эксперименте использовали загрузку в объеме 600 л полуопределенной среды, состоящей из 70% лактата и 30% глюкозы. После 14 ч инкубации при 39°C, полученную культуру охлаждали до комнатной температуры, и клетки собирали путем использования системы тангенциальной поточной фильтрации, описанной в примере 2. Удаляли из культуры девяносто девять процентов объема жидкости, и ретентат затем ресуспендировали в растворе криопротектор сахарозы при соотношении 1:5 с получением конечной концентрации сахарозы 5% в отношении веса к объему.

Смесь затем замораживали в жидком азоте, замороженные осадки переносили в лиофилизатор и лиофилизировали в режиме быстрого цикла. После завершения лиофилизации, лиофилизированный порошок собирали и расфасовывали (табл. 22) в анаэробных условиях в полиэтилентерефталатный пакет в чистом виде ("M.e.") или вместе с мальтодекстрином в качестве объемобразующего средства ("M.e. + мальтодекстрин").

Таблица 22. Заполнение полиэтилентерефталатного пакета

	Лиофилизированный порошок	Мальтодекстрин	Суммарная масса в пакете
М.е.	0,15 г	–	0,15 г
М.е. + мальтодекстрин	0,15 г	2,34 г	2,50 г

Концентрацию *M. elsdenii* в лиофилизированном продукте (3 образца на обработку) определяли путем ресуспендирования лиофилизированного продукта в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя, проведения регидратации продукта в течение 40 мин при комнатной температуре и затем высевания на полуопределенной лактатной агаровой среде (то есть, рассчитывали жизнеспособность клеток). Концентрацию *M. elsdenii* выражали через КОЕ/пакет и через log изменения.

В. Исследование срока годности

Полиэтилентерефталатные пакеты, содержащие различные обработки, хранили либо при комнатной температуре (25°C), либо при 4°C. Получали дополнительные образцы после 0,5, 1, 2, 3, 4 и 6 месяцев хранения, и обрабатывали их таким же образом, как описано ранее (3 образца на обработку на момент времени), для определения срока годности продукта. Концентрацию *M. elsdenii* выражали через КОЕ/пакет и через log изменения.

Данные по исследованию срока годности представлены на фиг. 28. На концентрацию *M. elsdenii* с течением времени оказывала влияние температура хранения. После 6 месяцев хранения, образцы, которые хранили при 4,4°C, сохраняли стабильность вне зависимости от присутствия или отсутствия мальтодекстрина, в то время как образцы, которые хранили при 23,9°C, теряли приблизительно 1,6 log в случае обработки "М.е." и приблизительно 0,8 log в случае обработки "М.е. + мальтодекстрин".

Пример 16. Рост, среда, температура и pH микробных клеток

Анаэробные бактерии могут быть подразделены на три категории: (1) строгие анаэробы; (2) аэротолерантные анаэробы; и 3) факультативные анаэробы. Строгие анаэробы представляют собой бактерии, которые не могут выживать при нормальных концентрациях кислорода в атмосфере. Некоторые строгие анаэробы могут выживать в атмосфере, содержащей вплоть до 8% кислорода, в то время как другие строгие анаэробы могут выживать только в тех случаях, когда концентрация кислорода составляет менее 0,5%. Аэротолерантные анаэробы могут выживать в присутствии кислорода, но они не утилизируют кислород для роста. Факультативные анаэробы способны использовать кислород для аэробного дыхания, но могут также использовать анаэробное дыхание, если кислород отсутствует.

Аналогично аэробные бактерии могут быть подразделены на две категории: (1) строгие аэробы; и (2) микроаэрофилы. Строгим аэробам требуется кислород для осуществления клеточного дыхания, и они могут выживать при нормальных концентрациях кислорода в атмосфере. Микроаэрофилам необходим кислород для клеточного роста, но на них оказывает вредное воздействие нормальные концентрации кислорода в атмосфере.

Дрожжевые грибы представляют собой одноклеточные, эукариотические микроорганизмы, которые относят к представителям царства грибов. Дрожжевые грибы могут быть строгими аэробами или факультативными анаэробами.

Бактерии *Megasphaera*, такие как *M. elsdenii*, и *Bifidobacterium*, такие как *B. breve*, являются представителями вида строгих анаэробов. Бактерии *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, и *Bifidobacterium*, такие как *B. animalis subsp. Lactis*, являются представителями вида аэротолерантных анаэробов. Бактерии *Pedococcus*, такие как *P. acidilactici*, и *Lactobacillus*, такие как *L. casei*, являются представителями вида факультативных анаэробов. Бактерия *Vacillus*, такая как *V. subtilis*, являются представителями вида строгого аэроба. *Saccharomyces*, такие как *S. boulardii* и *S. cerevisiae*, являются представителями вида дрожжевых грибов.

Аэробные бактерии, анаэробные бактерии и дрожжевые грибы выращивают на средах, включающих по меньшей мере один источник углерода, выбранный из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций. Кроме того, аэробные бактерии, анаэробные бактерии и дрожжевые грибы выращивают на средах, включающих по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, сорбита, тростникового сахара, ксилозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала, триптона, экстракта дрожжевых грибов и их комбинаций, анаэробные бактерии выращивают в анаэробных условиях или в условиях с требуемым содержанием кислорода для облегчения роста клеток анаэробных бактерий, а аэробные бактерии и дрожжевые грибы выращивают в подходящих по содержанию кислорода условиях в среде, включающей по меньшей мере два

источника углерода из приведенного выше перечня и при температуре от 15°C до 45°C в случае *L. plantarum*, и от 20°C до 45°C в случае *B. breve*, *B. animalis subsp. lactis*, *P. acidilactici*, *L. casei*, *S. boulardii* и *B. subtilis*. оптимальной температурой для этих штаммов является температура 37°C, за исключением *S. cerevisiae*, для которой предпочтительной является температура 30°C. величина pH среды составляет от 4,0 до 9, более конкретно, от величины pH 4,0 до 4,5, от 4,5 до 5,5, от 5,5 до 6,5, от 6,5 до 7,5, от 7,5 до 8,5, или от 8,5 до 9,0. микробов выращивают до того момента, пока не закончится фаза экспоненциального роста, то есть по меньшей мере в течение от 1 до 6 ч, от 6 до 12 ч, от 12 до 24 ч, от 24 до 36 ч, от 36 до 48 ч, от 48 до 72 ч, от 72 до 96 ч или от 96 до 120 ч.

После того, как содержание микробов в среде достигает величины по меньшей мере 1×10^3 КОЕ/г, микробов собирают при соответствующих условиях, и микробов лиофилизируют и/или инкапсулируют для использования в составах корма для животных.

Пример 17. Использование тангенциальной поточной фильтрации для концентрирования культур аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов

Методы, представленные в примере 2, используют в этом примере применительно к аэробным бактериям, анаэробным бактериям и дрожжевым грибам, описанным в примере 16, и применительно к использованию соответствующей среды, позволяющей обеспечивать оптимальный рост микробов. Так же как в случае бактерий *Megasphaera elsdenii*, использование тангенциальной поточной фильтрации применительно к аэробным бактериям (*Bacillus subtilis*), анаэробным бактериям (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Pediococcus acidilactici* и *Lactobacillus casei*), и дрожжевым грибам (*Saccharomyces boulardii* и *cerevisiae*) дает аналогичные результаты вне зависимости от количества жизнеспособных микробов, извлекаемых в пермеате и ретентате при осуществлении процесса концентрирования. Кроме того, процесс фильтрации не влияет на способность микробов к выживанию или способность микробов к росту после фильтрации. Поэтому, микробы выращивают в жидком бульоне, фильтруют и их подготавливают для замораживания, лиофилизации и/или инкапсулирования.

Пример 18. Параметры замораживания и лиофилизации для аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов.

Для определения влияния различных параметров замораживания и лиофилизации на различные типы аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов, в этом примере проводят эксперимент в соответствии с примером 17. Аналогично примеру 3, в качестве приемлемого предельного значения потери клеток устанавливали значение $1,6 \log$ КОЕ/мл.

Ретентаты *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii* и *Saccharomyces cerevisiae* ресуспендируют в криопротекторных растворах, не содержащих криопротектор, обезжиренное молоко, трегалозу, сахарозу или их комбинацию, перед лиофилизацией. Каждую смесь затем переносят во флаконы и медленно замораживают при -80°C или быстро замораживают в жидком азоте перед помещением в лиофилизатор для лиофилизации в режиме быстрого или медленного цикла.

Ретентаты, не смешиваемые с криопротектором, все характеризуются более высокой величиной потерь клеток, чем ретентаты, смешиваемые с растворами криопротекторов, и более высокой величиной потерь клеток, чем приемлемое предельное значение, вне зависимости от типа цикла лиофилирования или метода замораживания.

Кроме того, все процессы лиофилизации, которые подвергались испытанию, дают в результате продукты, которые способны сохранять достаточную жизнеспособность для инициирования роста культуры после регидратации, даже после длительного хранения от 4 до 12 месяцев при комнатной температуре или по меньшей мере температуре 4°C.

Пример 19. Влияние условий хранения на выход и стабильность лиофилизованных аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов

Методы испытания выживаемости клеток и характеристик роста микробов, описанные в примере 4, используют в этом примере применительно к аэробным бактериям, анаэробным бактериям и дрожжевым грибам, описанным в примере 16, и применительно к использованию соответствующей среды, позволяющей обеспечивать оптимальный рост микробов.

Для определения влияния протоколов лиофилизации и условий хранения на характеристики роста и срок годности *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii* и *Saccharomyces cerevisiae*, лиофилизованные культуры, полученные в примере 18, затем испытывают на характеристики микробного роста выживаемость клеток в процессе хранения при 4 или 25°C в аэробных или анаэробных условиях в течение 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 и 24 недель, используя анализ кривых роста и метод равномерно распределенного посева.

Образцы лиофилизованных анаэробных бактерий, которые хранят в аэробных условиях, вне зависимости от обработки, разлагаются более быстро с дополнительной потерей клеток по сравнению с их анаэробно хранимыми аналогами.

Образцы, которые хранят при 25°C, разлагаются быстрее, чем их аналоги, хранимые при 4°C.

Образцы, которые замораживают в жидком азоте и хранят при 25°C после лиофилизации, не теряют

больше клеток, чем их аналоги, хранимые при 4°C в течение 16 недель хранения; однако, различия между образцами являются значимыми для температур хранения 25 и 4°C после 20 и/или 24 недель хранения.

В каждый день взятия пробы проводят эксперимент по построению кривой роста для сравнения характеристик роста лиофилизированного продукта с нелиофилизированным продуктом. Нелиофилизированные образцы, которые используют для построения каждой кривой роста, являются "свежими" (полученными не более чем 2 дня назад). Лيوфилизированные продукты, хранимые при 4°C, имеют более короткий лаг времени, чем лиофилизированные продукты, хранимые при 25°C. После 16 недель хранения все образцы анаэробных бактерий, содержащие криопротектор, замороженные в жидком азоте, лиофилизированные и хранящиеся в анаэробных условиях, которые восстанавливают, снова являются жизнеспособными. Аналогично, все образцы аэробных бактерий и дрожжевых грибов, содержащих криопротектор, замороженные в жидком азоте и лиофилизированные, которые восстанавливают, также являются снова жизнеспособными.

Пример 20. Влияние условий хранения на выход и стабильность инкапсулированных лиофилизированных аэробных, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов

Замораживание и лиофилизация ретентатов различных аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов проводят, как описано в примерах 16-19. После лиофилизации, анаэробные бактерии смешивают с носителем (объемообразующим средством) и инкапсулируют путем распределения лиофилизированного порошка в нагретом масле, как описано в примере 14. Смесь затем быстро охлаждают и берут образец полученного продукта для определения выживаемости микробов. Образцы анаэробных микробов ресуспендируют в анаэробной камере с помощью анаэробного разбавителя и смешивают в течение 15 с, и регидратируют в течение 40 мин при комнатной температуре перед высеванием на полуопределенной лактатной агаровой среде. Образцы аэробных микробов ресуспендируют в атмосфере с нормальными концентрациями кислорода с помощью разбавителя, смешивают в течение 15 с и регидратируют в течение 40 мин при комнатной температуре перед высеванием на полуопределенной лактатной агаровой среде. Этот эксперимент повторяют три раза, используя различные температуры нагревания и различные типы масел (метод 1, 2 и 3). В методе 1 используется температура нагревания 110°C и дистиллят пальмового масла в качестве инкапсулирующего материала. В методе 2 используется температура нагревания 52°C и смесь моно- и диглицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в качестве инкапсулирующего материала. В методе 3 используется температура нагревания 65°C и смесь моно- и диглицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в качестве инкапсулирующего материала.

Процент потери клеток в результате инкапсулирования составляет менее чем 40% при использовании метода 2 или 3. После инкапсулирования различных аэробных бактерий, анаэробных бактерий и дрожжевых грибов, инкапсулированные микробы, которые хранят при комнатной температуре в условиях нормального содержания кислорода в атмосфере, характеризуются только слабым снижением жизнеспособности клеток на протяжении всего периода хранения (например, снижением жизнеспособности клеток на величину от 0,5 до 2-log).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения жизнеспособных клеток *Megasphaera elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, включающий:

(а) приготовление жидкой культуры в анаэробных условиях, включающей клетки *M. elsdenii* и питательную среду, включающую по меньшей мере два источника углерода, выбранных из группы, состоящей из казеина, лактата, декстрозы, фруктозы, фруктана, глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, ацетата, глицерина, маннита, тростникового сахара, ксилитозы, мелассы, фукозы, глюкозамина, декстрана, жира, масла, глицерина, ацетата натрия, арабинозы, соевого белка, растворимого белка, раффинозы, амилозы, крахмала и их комбинаций,

(b) концентрирование культуры в анаэробных условиях,

(c) сбор клеток в анаэробных условиях,

(d) добавление по меньшей мере одного криопротектора в собранные клетки,

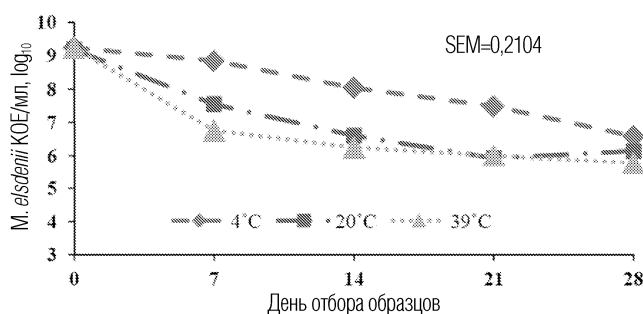
(e) замораживание клеток,

(f) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток *M. Elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, причем криопротектор представляет собой сахарозу, трегалозу, мальтодекстрин или их комбинацию.

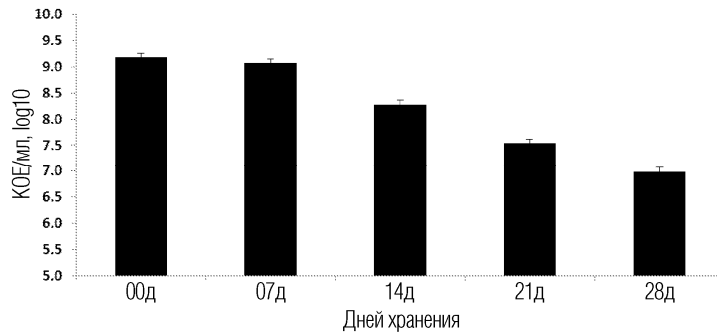
2. Способ по п.1, где по меньшей мере два источника углерода состоят из приблизительно 50-90% первого источника углерода и из приблизительно 10-50% второго источника углерода, где второй источник углерода отличается от первого источник углерода и где 100% по меньшей мере двух источников углерода состоят из первого источника углерода и второго источника углерода.

3. Способ получения жизнеспособных клеток *Megasphaera elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, включающий:

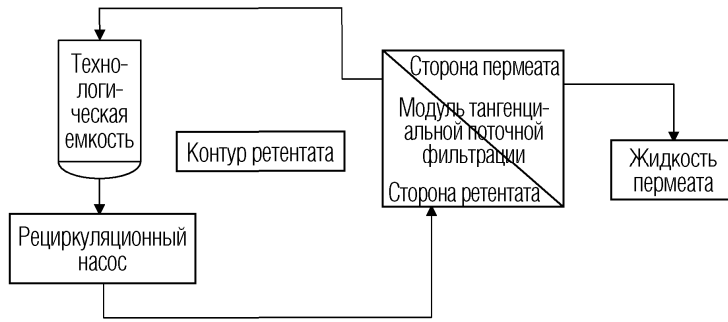
- (a) приготовление жидкой культуры, включающей клетки *M. elsdenii* и питательную среду в анаэробных условиях,
- (b) концентрирование культуры в анаэробных условиях,
- (c) сбор клеток в анаэробных условиях не позднее чем через 12 ч после того, как закончилась экспоненциальная фаза роста культуры, и перед тем, как началась стационарная фаза роста культуры,
- (d) добавление по меньшей мере одного криопротектора в собранные клетки,
- (e) замораживание клеток,
- (f) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток *M. Elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, причем криопротектор представляет собой сахарозу, трегалозу, мальтодекстрин или их комбинацию.
4. Способ по любому из пп.1-3, где сбор клеток включает по меньшей мере один метод, выбранный из группы, состоящей из центрифугирования, фильтрации, диализа, обратного осмоса и их комбинаций.
5. Способ по п.4, где фильтрация включает тангенциальную поточную фильтрацию.
6. Способ по любому из пп.1-5, где жидкая культура включает жидкость и где сбор клеток включает удаление от приблизительно 60 до приблизительно 100% жидкости.
7. Способ по любому из пп.1-6, где замораживание проводят при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -196°C .
8. Способ получения жизнеспособных клеток *Megasphaera elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, включающий:
- (a) приготовление жидкой культуры, включающей клетки *M. elsdenii* и питательную среду в анаэробных условиях,
- (b) концентрирование культуры в анаэробных условиях,
- (c) сбор клеток в анаэробных условиях,
- (d) добавление по меньшей мере одного криопротектора в собранные клетки,
- (e) замораживание клеток при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -196°C не позднее чем через 5 ч после сбора клеток,
- (f) лиофилизацию клеток, в результате чего получают от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток *M. Elsdenii* в коммерческом масштабе после лиофилизации, причем криопротектор представляет собой сахарозу, трегалозу, мальтодекстрин или их комбинацию.
9. Способ по любому из пп.1-8, где замораживание включает контактирование контейнера, включающего клетки *M. Elsdenii*, с жидким азотом.
10. Способ по любому из пп.1-9, где замораживание включает контактирование клеток с жидким азотом.
11. Способ по любому из пп.1-10, где замораживание проводят при температуре приблизительно -196°C и получают замороженные осадки, включающие клетки и где диаметр замороженных осадков составляет от приблизительно 0,0254 до приблизительно 12,7 мм.
12. Способ по любому из пп.1-11, где величина pH культуры *M. elsdenii* перед сбором клеток составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,0.
13. Способ по любому из пп.1-12, где по меньшей мере один криопротектор присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 20% (в отношении веса к объему) культуры.
14. Способ по любому из пп.1-13, где объем жидкой культуры составляет по меньшей мере приблизительно 50 л.
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что коммерческий масштаб имеет объем от приблизительно 2 до приблизительно 75000 л.
16. Способ по п.3, в котором коммерческий масштаб имеет объем от приблизительно 2 до приблизительно 75000 л.
17. Способ по п.8, в котором коммерческий масштаб имеет объем от приблизительно 2 до приблизительно 75000 л.



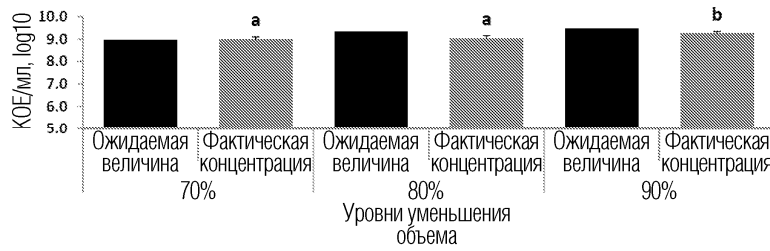
Фиг. 1



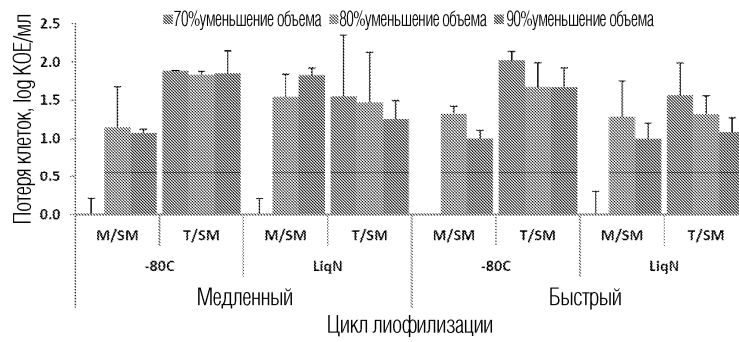
Фиг. 2



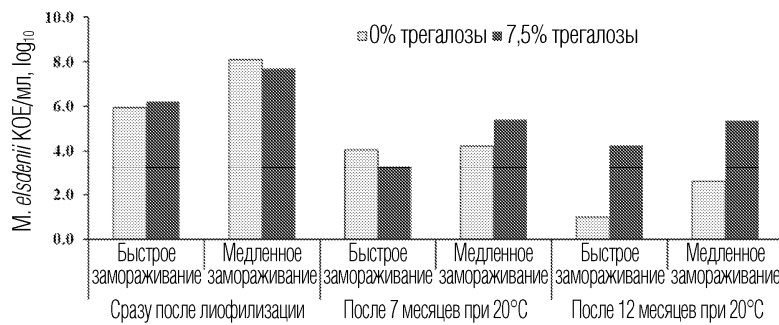
Фиг. 3



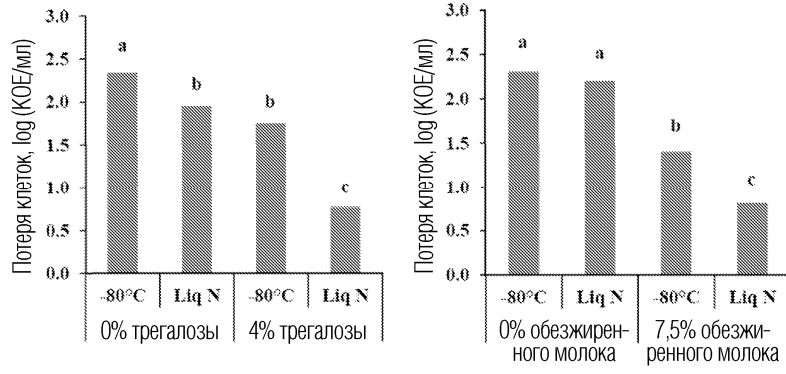
Фиг. 4



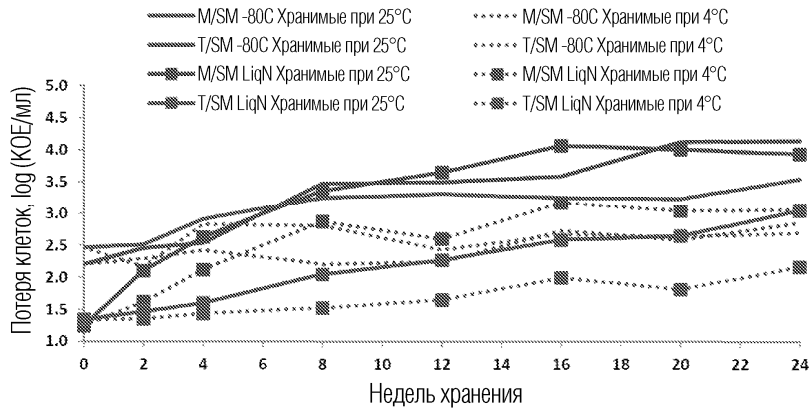
Фиг. 5



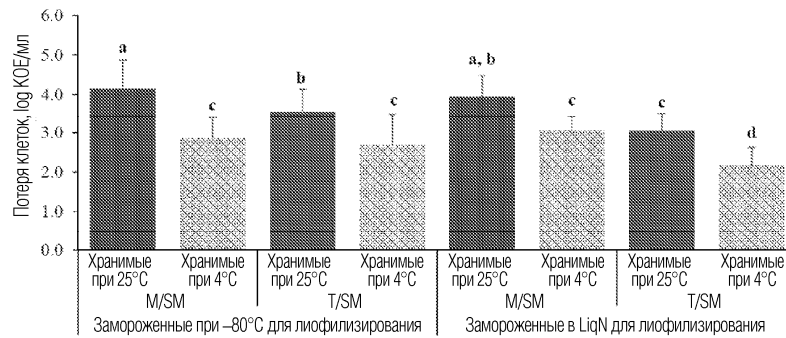
Фиг. 6



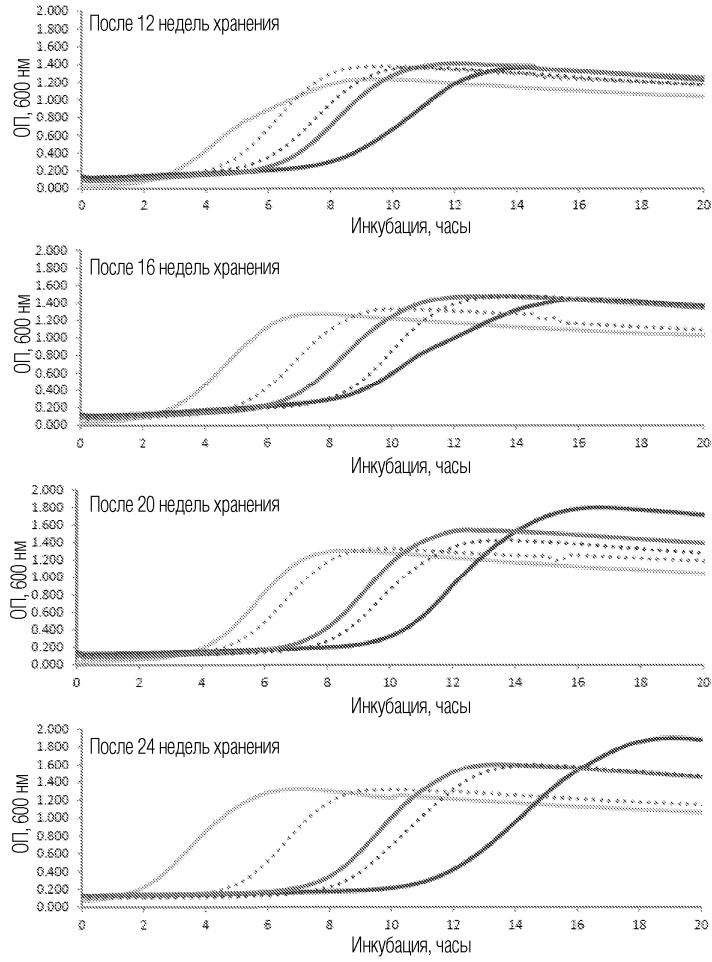
Фиг. 7



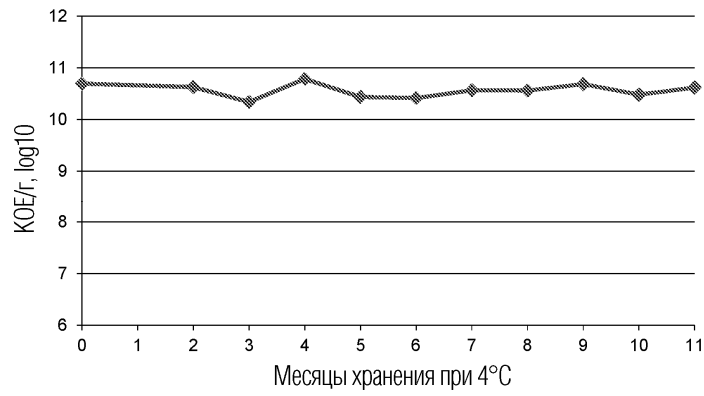
Фиг. 8



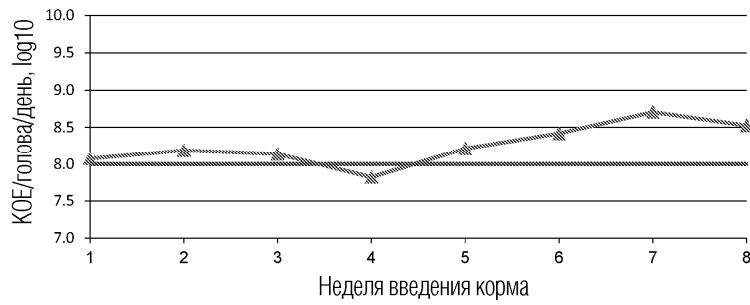
Фиг. 9



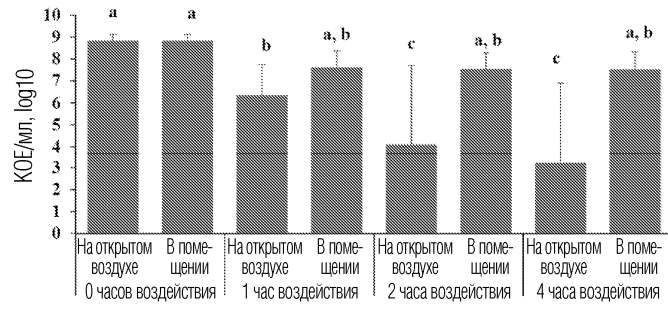
Фиг. 10



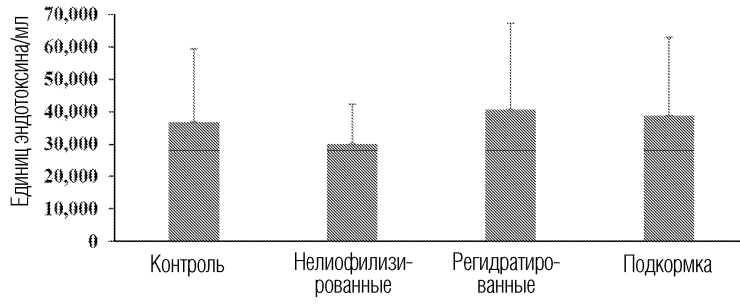
Фиг. 11



Фиг. 12



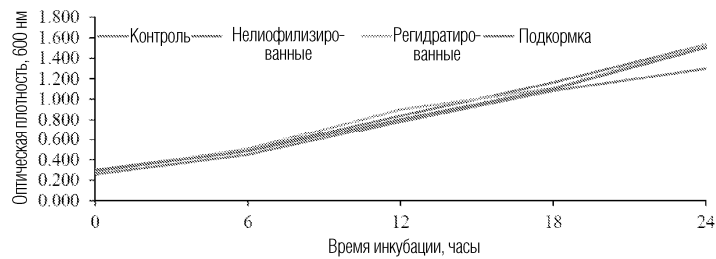
Фиг. 13



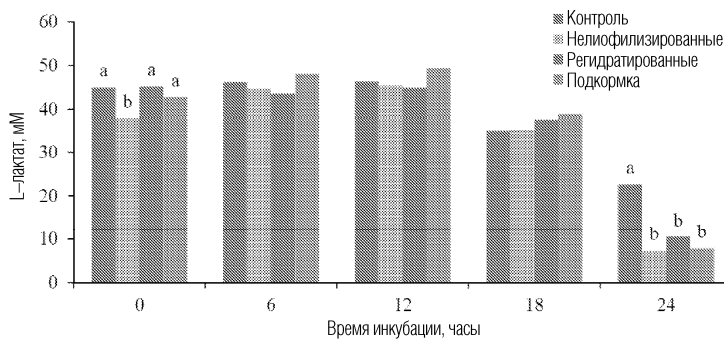
Фиг. 14



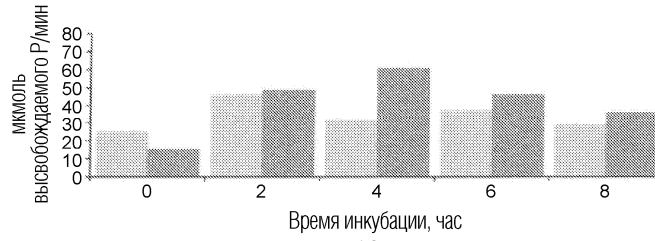
Фиг. 15



Фиг. 16



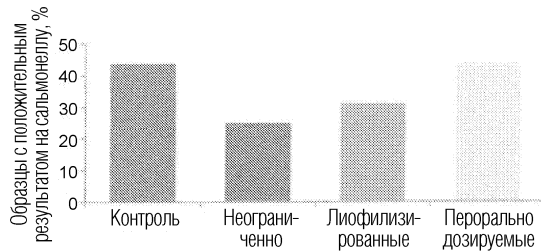
Фиг. 17



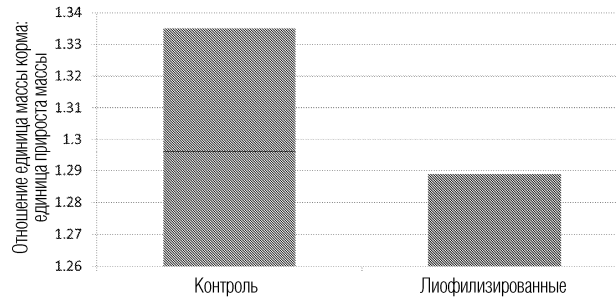
Фиг. 18



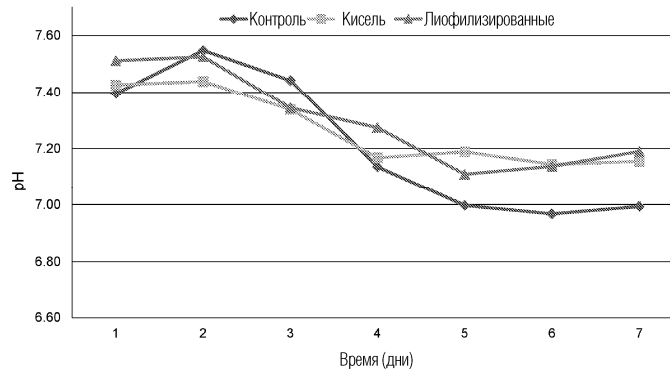
Фиг. 19



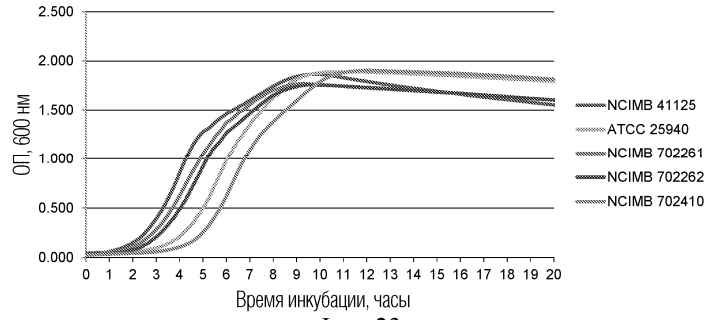
Фиг. 20



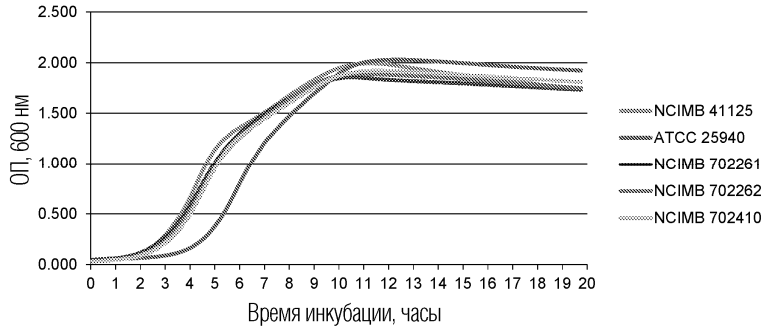
Фиг. 21



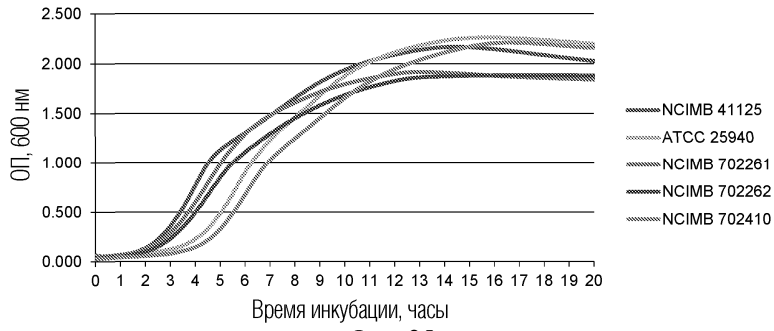
Фиг. 22



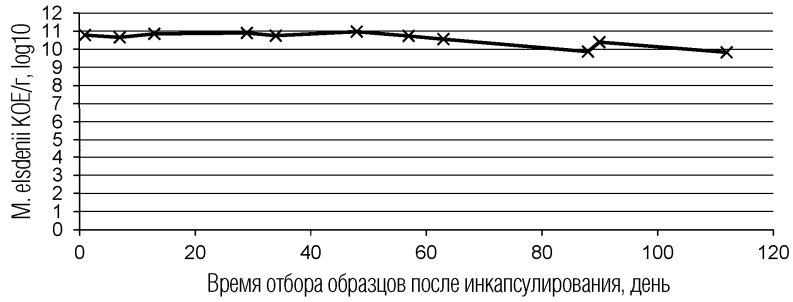
Фиг. 23



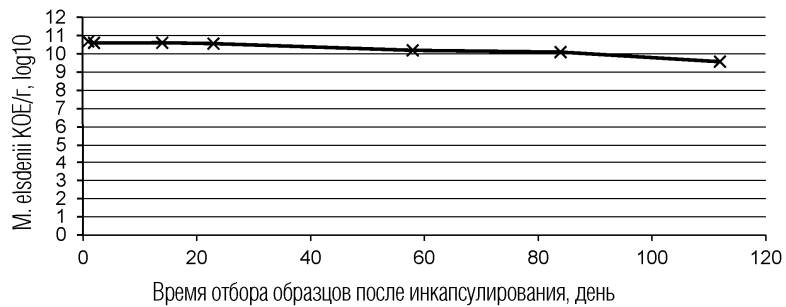
Фиг. 24



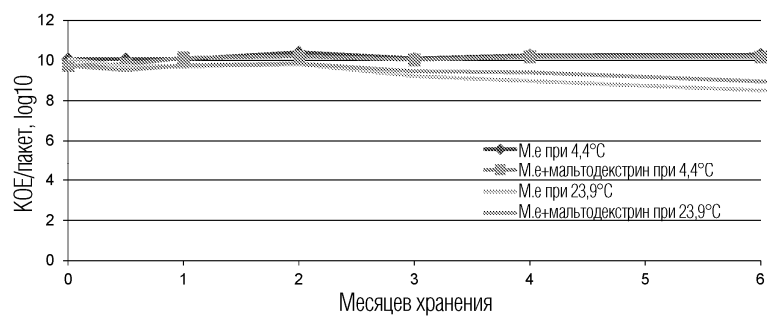
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

