



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2011129790/10, 16.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.12.2008 EP 08172353.8

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2013 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.07.2011(86) Заявка РСТ:
EP 2009/067273 (16.12.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/069990 (24.06.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

КР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Автор(ы):

**КАНТОР Метте Динес (DK),
ДЕРККС Патрик (DK),
КНАП Инге (DK),
КНАРРЕБОРГ Ане (DK),
ЛЕСЕР Томас Дюрманн (DK),
БЕНТЕ Лунн (DK)****(54) КОМПОЗИЦИЯ ПАЛОЧКОВИДНЫХ БАКТЕРИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ЖЕЛЧИ,
СЕКРЕТИРУЮЩИХ ВЫСОКИЕ УРОВНИ НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ****(57) Формула изобретения**

1. Композиция палочковидных бактерий (бацилл), включающая от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г споровых клеток бацилл, где указанная композиция характеризуется тем, что:

(i): споры палочковидных бактерий быстро прорастают и растут из спор в вегетативные клетки в присутствии среды с солями желчных кислот, включающей от 4 до 6 мМ солей желчных кислот, причем споры палочковидных бактерий достигают точки роста вегетативных клеток $0,4 OD_{630}$ за менее чем 18-19 ч, соответственно, где точка роста вегетативных клеток является точкой на кривой роста, где показатель OD начинает повышаться (в виду роста вегетативных клеток) непрерывно и достигает OD_{630} , равное 0,4;

(I) причем среда с солями желчных кислот является стандартной известной неселективной средой телячьего мясного бульона (VIB) из примера 1, в которую добавлена смесь солей желчных кислот, включающая конъюгированные соли желчной кислоты тауродооксихолат и гликодеоксихолат и деконъюгированные соли желчной кислоты тауродооксихолат в пропорциях 60% тауродооксихолата, 30% гликодеоксихолата и 10% деоксихолата; а

OD -анализ проводят, осуществляя следующие стадии:

(a): заполнение лунок пластины микротитратора 0,150 мл среды с солями желчных

кислот с 10^8 спор палочковидных бактерий на мл среды (время ноль); и

(b): инкубирование пластины при температуре 37°C при атмосферном давлении, измерение показателей OD_{630} , используя спектрофотометр, с перемешиванием перед каждым снятием данных для получения репрезентативной кривой роста во времени и

(ii) вегетативные клетки палочковидных бактерий продуцируют по меньшей мере одну незаменимую аминокислоту в количестве, большем, чем клетки контрольных палочковидных бактерий DSM 19467, где количество продуцированной незаменимой аминокислоты измеряют стандартным ГС-МС-методом на основе анализа аминокислоты по примеру 2 через два дня роста при температуре 37°C в известной стандартной с минимальным содержанием солей ростовой среде по примеру 2.

2. Композиция палочковидных бактерий по п.1, где споровые клетки палочковидных бактерий композиции присутствуют в виде высушенных споровых клеток (например, распылительной сушкой).

3. Композиция палочковидных бактерий по п.1 или 2, где клетки палочковидных бактерий представляют собой клетки *B. subtilis*.

4. Композиция палочковидных бактерий по п.1 или 2, где споры палочковидных бактерий достигают точки роста вегетативных клеток по меньшей мере на 3 ч раньше, чем споровые клетки контрольной *Bacillus subtilis*, депонированной как DSM 17231 («GalliPro®») при условиях точки (i) п.1.

5. Композиция палочковидных бактерий по п.1 или 2, где незаменимую аминокислоту выбирают из группы, состоящей из фенилаланина, валина, треонина, триптофана, изолейцина, метионина, лейцина, лизина, цистеина, тирозина, гистидина и аргинина.

6. Композиция палочковидных бактерий по п.5, где незаменимую аминокислоту выбирают из группы, состоящей из валина, изолейцина и лейцина.

7. Композиция палочковидных бактерий по п.6, где незаменимая аминокислота представляет лейцин.

8. Композиция палочковидных бактерий по п.1 или 2, где вегетативные клетки *Bacillus* предпочтительно продуцируют по меньшей мере одну незаменимую аминокислоту в количестве, по меньшей мере в 4 раза большем, чем клетки контрольной *Bacillus* DSM 19467 при условиях точки (ii) по п.1.

9. Способ кормления животного, включающий введение композиции палочковидных бактерий по любому из пп.1-8 животному вместе с другими ингредиентами кормового продукта для животного.

10. Способ кормления животного по п.9, где животное выбирают из группы, состоящей из домашней птицы, жвачных, телят, свиней, кроликов, лошадей, рыбы и домашних животных.

11. Способ скрининга и выделения новых клеток палочковидной бактерии, включающий следующие стадии:

(a): отбор и выделение из пула отдельных споровых клеток палочковидных бактерий новых споровых клеток палочковидных бактерий, способных прорасти и расти так быстро, чтобы достичь точки роста вегетативных клеток за менее чем 18-19 ч при условиях точки (i) по п.1;

(b): получение вегетативных клеток палочковидных бактерий из выделенных споровых клеток стадии (a) и мутирование новых отобранных и выделенных клеток с получением пула новых отдельных вегетативных клеток палочковидных бактерий;

(c): отбор и выделение из пула новых отдельных вегетативных клеток палочковидных бактерий стадии (b) новых вегетативных клеток палочковидных бактерий, способных продуцировать по меньшей мере одну незаменимую аминокислоту в количестве, большем, чем у контрольных клеток палочковидных бактерий DSM 19467, при условиях точки (ii) по п.1; и

(d): анализ высокой степени продуцирования вегетативных клеток палочковидных бактерий стадии (с) для подтверждения того, что сохраняется быстрое прорастание и рост, как на стадии (а), и выделение отобранных клеток палочковидных бактерий.

12. Способ скрининга и выделения новых клеток палочковидных бактерий по п.11, где клетки палочковидных бактерий представляют собой клетки *B. subtilis*.

R U 2 0 1 1 2 9 7 9 0 A

R U 2 0 1 1 1 2 9 7 9 0 A