



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 11/10 (2019.05); A23K 10/16 (2019.05); C12R 1/19 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017131520, 11.02.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.02.2016

Дата регистрации:
26.05.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.02.2015 US 62/114,829

(43) Дата публикации заявки: 12.03.2019 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 26.05.2020 Бюл. № 15

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.09.2017

(86) Заявка РСТ:
CA 2016/050129 (11.02.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/127260 (18.08.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

НАДО Эрик (СА)

(73) Патентообладатель(и):

ПРЕВТЕК МАЙКРОБИА ИНК. (СА)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013/142792 A1, 26.09.2013. RU
2191003 C2, 20.10.2002. RU 2535869 C2,
20.12.2014.

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ СУХАЯ МАТРИЦА ДЛЯ ВСТРАИВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ
ESCHERICHIA COLI, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены матрица, содержащая жизнеспособные непатогенные *Escherichia coli*, и способ получения матрицы. Матрица представлена в форме частицы, содержащей альгинат и покрытой полисахаридом мальтодекстрином или декстрином и дисахаридом, представленным сахарозой или трегалозой. Способ включает смешивание *Escherichia coli* с альгинатом с образованием

смеси, образование частиц из указанной смеси и контактирование указанных частиц с консервирующим раствором, содержащим сахарозу или трегалозу и мальтодекстрин или декстран; высушивание полученных частиц. Изобретения обеспечивают условия консервирования и хранения для бактерий с сохранением биологической активности. 2 н. и 6 з.п. ф-лы, 22 табл., 14 пр., 10 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 11/10 (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 11/10 (2019.05); A23K 10/16 (2019.05); C12R 1/19 (2019.05)

(21)(22) Application: **2017131520**, **11.02.2016**

(24) Effective date for property rights:
11.02.2016

Registration date:
26.05.2020

Priority:

(30) Convention priority:
11.02.2015 US 62/114,829

(43) Application published: **12.03.2019** Bull. № 8

(45) Date of publication: **26.05.2020** Bull. № 15

(85) Commencement of national phase: **11.09.2017**

(86) PCT application:
CA 2016/050129 (11.02.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/127260 (18.08.2016)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

NADEAU, Eric (CA)

(73) Proprietor(s):

PREVTEC MICROBIA INC. (CA)

(54) **IMPROVED DRY MATRIX FOR EMBEDDING VIABLE ESCHERICHIA COLI, A METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed are a matrix containing viable non-pathogenic *Escherichia coli*, and a method of producing a matrix. Matrix is presented in the form of a particle containing alginate and coated with polysaccharide with maltodextrin or dextrin and a disaccharide represented by sucrose or trehalose. Method involves mixing *Escherichia coli* with alginate

to form a mixture, forming particles from said mixture and contacting said particles with a preserving solution containing sucrose or trehalose and maltodextrin or dextran; drying obtained particles.

EFFECT: invention provides preservation and storage conditions for bacteria with preservation of biological activity.

8 cl, 22 tbl, 14 ex, 10 dwg

СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивают приоритет предварительной патентной заявки США с серийным номером 62/114,829, поданной 11 февраля 2015 года Eric Nadeau. Содержание указанного выше документа включено в настоящий документ посредством

ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Эта заявка в целом относится к области усовершенствованных сухих матриц для встраивания жизнеспособной *E. coli*, способу ее получения и ее использования.

ПРЕДПОСЫЛКИ

Бактериальные споры представляют собой покоящиеся жизненные формы, которые могут существовать в обезвоженном и дегидратированном состоянии неопределенно долго. Для человека бактериальные споры доступны или в виде безрецептурных профилактических средств для легких нарушений желудочно-кишечного тракта, таких как диарея, или в виде лечебного питания или пищевых добавок. В сельскохозяйственной промышленности бактериальным спорам также уделяют возрастающее внимание в качестве потенциальных альтернатив для антибиотиков в качестве промоторов роста (Hong et al., FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29: 813-835). Однако *Escherichia coli* (*E. coli*) не образует спор и по существу менее устойчива к условиям обезвоживания и/или дегидратации, чем спорообразующие бактерии. Тем не менее, во многих применениях необходимо консервировать и хранить бактерии *E. coli* в форме, которая обладает достаточной жизнеспособностью и/или достаточной бактериальной биологической активностью для данной цели.

В связи с этим, ранее предложены различные практические условия консервирования и хранения для бактерий.

Лиофилизацию часто используют для консервирования и хранения бактерий по причине воздействия низкой температуры во время сушки (Rhodes, Exploitation of microorganisms, ред. Jones, DG, 1993, стр. 411-439, London: Chapman & Hall). Однако она обладает нежелательной характеристикой значительного снижения жизнеспособности, а также требует много времени и энергии. Предложены защитные средства, но защита, которую обеспечивает данная добавка во время лиофилизации, меняется в зависимости от вида микроорганизма (Font de Valdez et al., Cryobiology, 1983, 20: 560-566).

Воздушную сушку, такую как с использованием обезвоживания, также использовали для консервирования и хранения бактерий. Хотя вакуумная сушка представляет собой процесс, схожий с лиофилизацией, он происходит при 0-40°C в течение от 30 мин до нескольких часов. Преимущества этого процесса состоят в том, что продукт не замораживают, так что потребление энергии и связанное экономическое влияние уменьшены. С точки зрения продукта, избегают криоповреждения. Однако обезвоживание при низкой температуре или температуре окружающей среды происходит медленно, требует дополнительных предосторожностей для того, чтобы избежать контаминации, и часто дает неудовлетворительную жизнеспособность (Lievense et al., Adv Biochem Eng Biotechnol., 1994, 51:71-89).

Инкапсулирование бактерий в образующей гидроколлоид полисахаридной матрице, такой как гранулы альгината кальция (альгинат Ca), также использовали для консервирования и хранения бактерий в широком и увеличивающемся диапазоне различных применений (Islam et al., J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 20:1367-1377). Для того, чтобы поддерживать бактерии в метаболически и физиологически компетентном состоянии и, таким образом, получать желаемый эффект, предложено добавлять в такие матрицы подходящий консервантный состав. Консервантные составы типично

содержат активные ингредиенты в подходящем носителе и добавки, которые содействуют стабилизации и защите микробных клеток во время хранения, транспортировки и в целевой зоне.

Маннит описан в качестве эффективного компонента консервантного состава для инкапсулированных в альгинат Са бактерий во время лиофилизации, поскольку он обеспечивает высокую бактериальную жизнеспособность вплоть до 10 недель при комнатной температуре и активности воды (a_w) меньше чем 0,2 (Efiuvwevwere et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 51:100-104). Синергическая смесь трегалозы и сахароспирта также описана в качестве эффективного компонента консервантного состава для высушенных воздухом инкапсулированных в альгинат Са бактерий, где трегалозу используют взамен сахарозы из-за ее значительно более высокой температуры стеклования, т. е., 110°C против только 65°C, соответственно (U.S. 8,097,245). Синергическая смесь солей карбоновых кислот и гидролизированных белков также описана в качестве эффективного компонента консервантного состава для лиофилизированных инкапсулированных в альгинат Са бактерий (U.S. 2013/0,296,165). В обоих случаях синергическая смесь дает расширенную стекловидную структуру без необходимости образования пены или кипячения под вакуумом для того, чтобы содействовать эффективной сушке.

Однако разработка новых составов представляет собой сложную задачу, и не все составы эффективны для данных бактерий (Young et al., Biotechnol Bioeng., 2006 Sep 5;95(1):76-83).

В свете приведенного выше существует необходимость обеспечивать усовершенствованные условия консервирования и хранения для бактерий *E. coli*.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

Настоящее раскрытие в целом относится к жизнеспособным *Escherichia coli* (*E. coli*), встроенным в матрицу, где указанная матрица имеет активность воды (a_w) $\leq 0,3$ и где указанная матрица содержит первый полисахарид, который представляет собой образующий гидроколлоид полисахарид, второй полисахарид, который отличается от первого полисахарида, и дисахарид, который включает сахарозу, трегалозу или их сочетание.

Настоящее раскрытие также в целом относится к композиции для формирования матрицы, указанная композиция содержит первый полисахарид, который представляет собой образующий гидроколлоид полисахарид, второй полисахарид, который отличается от первого полисахарида, и дисахарид, который включает сахарозу, трегалозу или их сочетание, и *Escherichia coli* (*E. coli*).

Настоящее раскрытие также в целом относится к способу предоставления частицы, содержащей жизнеспособные *Escherichia coli* (*E. coli*).

Настоящее раскрытие также в целом относится к матрице, содержащей жизнеспособные *Escherichia coli* (*E. coli*), где указанная матрица имеет активность воды (a_w) $\leq 0,3$ и где указанная матрица содержит первый полисахарид, который представляет собой образующий гидроколлоид полисахарид, второй полисахарид, который отличается от первого полисахарида, и дисахарид, который включает сахарозу, трегалозу или их сочетание.

Все признаки вариантов осуществления, которые описаны в этом раскрытии и не являются взаимоисключающими, можно комбинировать друг с другом. Элементы одного из вариантов осуществления можно использовать в других вариантах осуществления без дополнительного упоминания. Другие аспекты и признаки

настоящего изобретения будут видны средним специалистам в данной области при рассмотрении следующего описания конкретных вариантов осуществления в сочетании с сопроводительными фиг.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

5 Подробное описание конкретных вариантов осуществления предоставлено в настоящем документе далее со ссылкой на сопроводительные рисунки, на которых:

 На фиг. 1 представлена неограничивающая потоковая диаграмма для получения культуры бактерий в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

10 На фиг. 2 представлена неограничивающая потоковая диаграмма для сушки гранул со встроенными *E. coli* в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 3 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой показан эффект консервирующих растворов S1, S2, S3 и S4, оказываемый на
15 жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 4 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой показан эффект консервирующих растворов S1, S5, S6 и S7, оказываемый на
20 жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 5 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой показан эффект консервирующих растворов S1, S0, S8 и S9, оказываемый на
 жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

25 На фиг. 6 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой показан эффект консервирующих растворов S1, S10, S11 и S12, оказываемый на жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 7 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой
30 показан эффект консервирующих растворов S1, S13, S14 и S15, оказываемый на жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 8 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой
35 показан эффект консервирующих растворов S1, S16, S17 и S18, оказываемый на жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 9 представлена неограничивающая столбчатая диаграмма, на которой
40 показан эффект консервирующих растворов S1 и S19, оказываемый на жизнеспособность бактерий после сушки воздухом в соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию.

 На фиг. 10 представлены исходные данные, относящиеся к фиг. с 3 до 9.

 На фиг. варианты осуществления проиллюстрированы в качестве примера. Следует ясно понимать, что описание и фиг. приведены только с целью иллюстрирования определенных вариантов осуществления и способствуют пониманию. Объем формулы
45 изобретения не следует ограничивать вариантами осуществления, изложенными в настоящем раскрытии, но следует давать ему самую широкую интерпретацию в соответствии с описанием в целом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Конкретные примеры далее описаны для того, чтобы иллюстрировать, каким образом принципы настоящего раскрытия можно реализовать на практике.

В настоящем документе описанные бактерии *E. coli* представляют собой жизнеспособные бактерии, другими словами, хотя бактерии встроены в сухую матрицу, можно рассматривать как находящиеся в неактивном состоянии, эти бактерии можно восстанавливать до активного состояния при воздействии на матрицу влагой.

В настоящем документе описанные бактерии *E. coli* содержат какой-либо рекомбинантный или дикий штамм *E. coli* или какие-либо их смеси. В одном из вариантов осуществления *E. coli* представляет собой непатогенный штамм. В одном из вариантов осуществления непатогенный штамм *E. coli* представляет собой штамм, депонированный в International Depository Authority of Canada (IDAC) 21 января 2005 года под номером доступа IDAC 210105-01, или штамм, депонированный в International Depository Authority of Canada (IDAC) 20 июня 2013 года, которому присвоен номер доступа 200613-01, или их сочетание.

В настоящем документе описанная матрица содержит образующий гидроколлоид полисахарид. Несколько полисахаридов пригодны для использования, как описано в настоящем документе, отдельно или в каком-либо их сочетании.

Высокоамилозный крахмал представляет собой полисахарид, способный формировать плотный гель после гидратации гранул крахмала в кипящей воде, диспергирования гранул с помощью смесителя с высоким усилием сдвига и последующего охлаждения раствора приблизительно до 0-10°C. Плотность и прочность геля зависит от концентрации крахмала в растворе, причем максимальная рабочая концентрация составляет вплоть до 10% масс./об. Нарезанная крахмальная гелевая матрица также способна сохранять живые бактерии в консервирующей смеси и, поскольку она главным образом не переваривается в кишечных или желудочном соках, бактерии защищены от разрушения в желудке, пока находятся внутри крахмальной матрицы. Механизм контролируемого высвобождения обеспечивают за счет того факта, что высокоамилозный крахмал легко поддается перевариванию с помощью микрофлоры кишечника, во время которого затем происходит высвобождение доставленных живых бактерий в их интактной форме.

Пектин представляет собой другой подходящий полисахарид, который работает очень сходно с высокоамилозным крахмалом. Пектин имеет дополнительное преимущество, поскольку прочность пектиновой гелевой матрицы можно дополнительно увеличивать посредством добавления двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} , который формирует мостики между карбоксильными группами сахарных полимеров.

Альгинат представляет собой другой подходящий полисахарид, который может формировать плотную гелевую матрицу посредством сшивки с использованием двухвалентных катионов. Альгинат можно уплотнять до плотной гелевой матрицы посредством внутренней сшивки альгинатных полисахаридов с использованием дикатиона, например, Ca^{2+} , например, посредством экструзии альгината в форме тонких нитей, струн или по существу сферических гранул в ванну с Ca^{2+} . Альгинат затвердевает при взаимодействии с Ca^{2+} . Альтернативный способ получения матрицы состоит в атомизации смеси распылением в ванную с Ca^{2+} .

В одном из вариантов осуществления образующий гидроколлоид полисахарид присутствует в матрице в проценте по массе от общего сухого вещества со значением от 0,1% до 20%. В одном из вариантов осуществления образующий гидроколлоид полисахарид присутствует в матрице в процент по массе от общего сухого вещества в

значении от 0,1% до 19%, или от 0,1% до 18%, или от 0,1% до 17%, или от 0,1% до 16%, или от 0,1% до 15%, или от 0,1% до 14%, или от 0,1% до 13%, или от 0,1% до 12%, или от 1% до 12%, включая какие-либо значения между.

В настоящем документе описанная матрица дополнительно содержит дисахарид и полисахарид. В настоящем раскрытии раскрыты некоторые концентрации и пропорции, подходящие для включения в матрицу. В одном из вариантов осуществления подходящее соотношение дисахарид/полисахарид в % масс./% масс. составляет меньше чем 10 или более предпочтительно меньше чем 5. В одном из вариантов осуществления соотношение дисахарид/полисахарид в % масс./% масс. составляет приблизительно 1.

В одном из вариантов осуществления дисахарид присутствует в матрице в проценте по массе от общего сухого вещества при значении от 0,1% до 90%, или от 0,1% до 75%, или от 0,1% до 50%, или от 0,1% до 35%, или от 0,1% до 20%, или от 0,1% до 15%, или от 0,1% до 10%, включая какие-либо значения между.

В одном неограничивающем варианте осуществления дисахарид включает сахарозу.

В дополнительном неограничивающем варианте осуществления, дисахарид включает трегалозу.

В одном неограничивающем варианте осуществления полисахарид включает мальтодекстрин.

В дополнительном неограничивающем варианте осуществления полисахарид включает декстран.

В дополнительном неограничивающем варианте осуществления, декстран имеет молекулярную массу между 20 и 70 кДа.

В одном из вариантов осуществления матрица дополнительно содержит соль L-глутаминовой кислоты. В одном неограничивающем варианте осуществления соль представляет собой соль натрия и L-глутаминовой кислоты.

В настоящем документе описанная матрица имеет активность воды (« a_w »), которая составляет $0,04 \leq a_w \leq 0,3$, например, $0,04 \leq a_w \leq 2,5$, $0,04 \leq a_w \leq 2,0$, $0,04 \leq a_w \leq 1,5$ и т. п. «Активность воды» или « a_w » в контексте настоящего раскрытия относится к

доступности воды и представляет энергетическое состояние воды в системе. Активность воды можно измерять в соответствии с материалами и процедурами, известными в данной области, например, с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.).

Также предусмотрена композиция для формирования матрицы, композиция содержит первый образующий гидроколлоид полисахарид, второй полисахарид, который отличается от первого полисахарида, и дисахарид, который включает сахарозу, трегалозу или их сочетание, и *Escherichia coli* (*E. coli*).

Также предусмотрен способ предоставления частицы, содержащей жизнеспособные *Escherichia coli* (*E. coli*), способ включает предоставление частиц, содержащих первый образующий гидроколлоид полисахарид, второй полисахарид, который отличается от первого полисахарида, и дисахарид, который включает сахарозу, трегалозу или их сочетание, и *E.coli*, и сушку указанных частиц до активности воды (a_w) $\leq 0,3$.

В одном неограничивающем варианте осуществления жизнеспособные *E. coli* выдерживают кратность уменьшения a_w в частицах по меньшей мере 0,4, или по меньшей мере 0,5, или по меньшей мере 0,6, или по меньшей мере 0,7.

ПРИМЕРЫ

В каждом из следующих примеров тестировали три консервирующих раствора наряду с консервирующим раствором S1. Тесты осуществляли в трех повторениях и одно

стандартное отклонение вычисляли в соответствии со следующей формулой:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

где n - число образцов, $\bar{x}$ - среднее по выборке образцов.

В каждом из следующих примеров жизнеспособность бактерий оценивали посредством измерения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) в соответствии с протоколами, известными в данной области.

Консервирующие растворы, используемые в следующих примерах, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Консервирующий раствор	Полисахарид	Дисахарид	Соль L-глутаминовой кислоты	Соотношение полисахарида/ дисахарида/соли органической кислоты
S0	x ¹	x	x	N/A ²
S1	декстран 40	сахароза	да	5:7:1
S2	декстран 40 (5% масс.)	x	x	N/A
S3	x	Сахароза (7% масс.)	x	N/A
S4	декстран 40	трегалоза	да	5:7:1
S5	декстран 20	сахароза	да	5:7:1
S6	декстран 70	сахароза	да	5:7:1
S7	мальтодекстрин	сахароза	да	5:7:1
S8	декстран 40	сахароза	да	10:1:1
S9	декстран 40	сахароза	да	1:10:1
S10	декстран 40 (другой производитель)	сахароза	да	5:7:1
S11	x	сахароза	да	7:1
S12	декстран 70	трегалоза	да	5:7:1
S13	декстран 40	сахароза	x	5:7
S14	декстран 40	сахароза	да	5:3:1
S15	декстран 40	сахароза	да	5:5:1
S16	мальтодекстрин	трегалоза	да	5:7:1
S17	мальтодекстрин	трегалоза	да	10:1:1
S18	мальтодекстрин	трегалоза	да	1:10:1
S19	декстран 40	Мальтоза	да	5:7:1

¹ x обозначает отсутствие

² N/A обозначает неприменимость

1. Пример 1

а. Культура E. coli

Со ссылкой на фиг. 1, штамм E. coli культивировали на первой стадии 100 на триптическом соевом агаре не животного происхождения. Шесть (6) выделенных колоний затем использовали для того, чтобы культивировать штамм E. coli на второй стадии 200 в течение 2 часов при 37°C и перемешивании на 200 об./мин в 30 мл триптического соевого бульона (TSB) не животного происхождения (для 1 л TSB: 20 г соевого пептона A3 SC - (Organotechnie), 2,5 г безводной декстрозы USP - (J.T. Baker), 5 г хлорида натрия USP - (J.T. Baker) и 2,5 г гидроортофосфата калия USP - (Fisher Химическ*)). Получаемую культуру 1 разводили в 10 раз в TSB и затем использовали для того, чтобы культивировать штамм E. coli на третьей стадии 300 в течение 2 часов

при 37°C и перемешивании на 200 об./мин в 100 мл TSB не животного происхождения. Получаемую культуру 2 разводили в 10 раз в TSB и затем использовали для того, чтобы культивировать штамм *E. coli* на четвертой стадии 400 в течение 5 часов при 37°C и перемешивании на 200 об./мин в 1 л TSB не животного происхождения. Получаемую культуру 3 затем использовали для встраивания *E. coli* в матрицу. Вариации и уточнения для культурального протокола, описанного в настоящем документе, возможны и будут видны специалистам в данной области в свете данных положений. Например, непатогенные *E. coli* также можно культивировать в анаэробных условиях в соответствии с протоколами, известными в данной области (Son & Taylor, Curr. Protoc. Microbiol., 2012, 27:5A.4.1-5A.4.9). При получении гранул в последующих примерах можно выбирать непатогенный штамм *E. coli*, депонированный в International Depository Authority of Canada (IDAC) 21 января 2005 года под номером доступа IDAC 210105-01.

b. Получение матрицы

Пептон Vacto™ (1,5 г, BD, Mississauga, Canada) смешивали с 1,5 л нагретой воды для получения смеси. Альгинат (30 г Grindsted®, DuPont™ Danisco®, Mississauga, Canada) медленно добавляли в смесь при перемешивании магнитной мешалкой на 360 об./мин. Полной солиubilизации альгината достигали приблизительно за 3 ч для того, чтобы получать 2% раствор альгината (масс./об.). Затем раствор, содержащий магнитную мешалку, автоклавировали при стандартных условиях. Вариации и уточнения в протоколе получения матрицы, описанном в настоящем документе, возможны и будут видны специалистам в данной области в свете данных положений.

с. Встраивание *E. coli* в матрицу

Следующее добавляли, по порядку и при перемешивании с использованием магнитной мешалки, в автоклавированный раствор матрицы для того, чтобы получать взвесь: 1 л TSB не животного происхождения и, со ссылкой на фиг. 1, 0,5 л получаемой культуры 3 *E. coli* в 1 л TSB не животного происхождения. Взвесь экстрадировали в ванну для полимеризации (300 mM CaCl₂, 0,1% масс./об. триптона Vacto™, 0,1% масс./об. пептона Vacto™ и 0,05% масс./об. г дрожжевого экстракта Vacto™ в воде) для того, чтобы формировать гранулы с использованием шприцевой системы с 9 выходами, адаптированной из испарителей Thermo Scientific™ Reacti-Vap™. Ванну осторожно перемешивали, пока инъецировали взвесь. Гранулам матрицы позволяли сшиваться в течение приблизительно 30 минут и затем собирали получаемые затвердевшие гранулы. Вариации и уточнения в протоколе встраивания, описанном в настоящем документе, возможны и будут видны специалистам в данной области в свете данных положений.

d. Сушка и тестирование встроенных *E. coli*

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы со встроенными *E. coli* в матрице помещали в консервирующий раствор S1, консервирующий раствор S2, консервирующий раствор S3 или консервирующий раствор S4 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов

осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 3. Консервирующий раствор S4 демонстрировал нормализованную усредненную утрату жизнеспособности 0,32, при этом поддерживая активность воды $0,142 \pm 0,004$.

Компиляция результатов из примера 1 изложена в таблицах 2 и 3. Эти результаты демонстрируют, что элементы консервирующего раствора S4 обеспечивали достоверный эффект, оказываемый на жизнеспособность *E. coli*, встроенных в высушенную матрицу, и их устойчивость в процессе сушки 700.

Таблица 2

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$3 \times 10^{11} \pm 9 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{11} \pm 4,3 \times 10^9$	$0,32 \pm 0,14$	1
S2	$2,3 \times 10^{11} \pm 5,5 \times 10^{10}$	$5,4 \times 10^9 \pm 2,7 \times 10^9$	$1,66 \pm 0,3$	5,18
S3	$2,6 \times 10^{11} \pm 4,9 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10} \pm 4,3 \times 10^{10}$	$0,61 \pm 0,32$	1,90
S4	$3,1 \times 10^{11} \pm 7 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{11} \pm 9,7 \times 10^{10}$	$0,11 \pm 0,08$	0,34

Таблица 3

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,473 \pm 0,020$	$0,165 \pm 0,010$	0,65
S2	$0,278 \pm 0,021$	$0,054 \pm 0,009$	0,81
S3	$0,423 \pm 0,022$	$0,150 \pm 0,026$	0,64
S4	$0,488 \pm 0,022$	$0,142 \pm 0,004$	0,71

е. Включение высушенных встроенных *E. coli* в пищу («получение пеллетов»)

Протокол для включения высушенной матрицы в пищу, например, в форме пищевой добавки, известен в данной области. Иллюстративный пример выполнения этого можно осуществлять, например, посредством включения от 500 г до 1000 г высушенных гранул матрицы в тонну пищи. При желании, пища также может содержать инактивированный продукт дрожжей в подходящем количестве. Например, высушенные гранулы матрицы, содержащие встроенные *E. coli*, смешивают в баке для гомогенизации со всеми другими ингредиентами. Предпочтительно, смесь непрерывно перемешивают во время процесса

получения пеллетов. Затем перемешанный материал прокачивают в направлении экструдера. Затем пар применяют к перемешанному материалу, который почти поступил в экструдер (т. е., таким образом на этом этапе повышают температуру смеси). Затем прикладывают подходящее давление к смеси во время ее прохождения внутрь экструдера (повышение давления и температуры, точка с наивысшей достигаемой температурой составляет приблизительно 75°C). Затем сформированные пеллеты выталкивают из экструдера в охлаждающий бак (быстрое падение температуры до 30-40°C, после чего следует другое охлаждение, чтобы достичь температуры окружающей среды). Затем пеллетированную пищу, содержащую пищевую добавку (матрицу, содержащую встроенную *E. coli*) можно хранить, например, в мешках/контейнерах. Вариации и уточнения для протокола получения пеллетов, описанного в настоящем документе, возможны и будут видны специалистам в данной области в свете данных положений.

2. Пример 2

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в консервирующий раствор S1, консервирующий раствор S5, консервирующий раствор S6 или консервирующий раствор S7 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 4. Консервирующий раствор S7 демонстрировал нормализованную усредненную утрату жизнеспособности 0,38, при этом поддерживая активность воды $0,298 \pm 0,013$.

Компиляция результатов из примера 2 изложена в таблицах 4 и 5. Эти результаты демонстрируют, что элементы консервирующего раствора S7 обеспечивали значимый

защитный эффект, оказываемый на жизнеспособность *E. coli*, встроенных в высушенную матрицу, и их устойчивость в процессе сушки 700.

Таблица 4

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$3,3 \times 10^{11} \pm 9,2 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{11} \pm 2,7 \times 10^{10}$	$0,26 \pm 0,07$	1
S5	$3,5 \times 10^{11} \pm 7,7 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{11} \pm 6 \times 10^{10}$	$0,13 \pm 0,17$	0,5
S6	$3,1 \times 10^{11} \pm 5,8 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11} \pm 1,7 \times 10^{11}$	$0,10 \pm 0,29$	0,38
S7	$3,4 \times 10^{11} \pm 3,7 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$	$0,10 \pm 0,06$	0,38

Таблица 5

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,535 \pm 0,020$	$0,230 \pm 0,012$	0,57
S5	$0,530 \pm 0,049$	$0,249 \pm 0,009$	0,53
S6	$0,586 \pm 0,143$	$0,260 \pm 0,013$	0,56
S7	$0,541 \pm 0,045$	$0,298 \pm 0,013$	0,45

3. Пример 3

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S0, консервирующего раствора S8 или консервирующего раствора S9 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов,

полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 5.

Компиляция результатов из примера 3 изложена в таблицах 6 и 7.

Таблица 6

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$2,2 \times 10^{11} \pm 2,9 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{11} \pm 9,3 \times 10^9$	$0,11 \pm 0,05$	1
S0	$1,9 \times 10^{11} \pm 2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$	$5,28 \pm 0,53$	47,7
S8	$2,8 \times 10^{11} \pm 4,6 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^{10} \pm 2,3 \times 10^{10}$	$0,70 \pm 0,15$	6,28
S9	$2,4 \times 10^{11} \pm 5,4 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{10}$	$0,18 \pm 0,04$	1,64

Таблица 7

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,453 \pm 0,010$	$0,241 \pm 0,005$	0,47
S0	$0,331 \pm 0,022$	$0,037 \pm 0,002$	0,89
S8	$0,366 \pm 0,010$	$0,062 \pm 0,006$	0,83
S9	$0,451 \pm 0,010$	$0,275 \pm 0,032$	0,39

4. Пример 4

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S10, консервирующего раствора S11 или консервирующего раствора S12 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и

нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 6. Консервирующий раствор S7 демонстрировал нормализованную усредненную утрату жизнеспособности 0,58.

Компиляция результатов из примера 4 изложена в таблицах 8 и 9.

Таблица 8

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$3,7 \times 10^{11} \pm 5,2 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11} \pm 4,46 \times 10^{10}$	$0,12 \pm 0,01$	1
S10	$4 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,11 \times 10^{10}$	$0,07 \pm 0,12$	0,58
S11	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,9 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11} \pm 1,77 \times 10^{10}$	$0,24 \pm 0,03$	1,91
S12	$4 \times 10^{11} \pm 2,9 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{11} \pm 9,27 \times 10^{10}$	$-0,12 \pm 0,08$	-0,94

Таблица 9

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,475 \pm 0,023$	$0,123 \pm 0,007$	0,74
S10	$0,490 \pm 0,026$	$0,135 \pm 0,007$	0,72
S11	$0,419 \pm 0,016$	$0,201 \pm 0,038$	0,52
S12	$0,494 \pm 0,026$	$0,165 \pm 0,006$	0,66

5. Пример 5

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S13, консервирующего раствора S14 или консервирующего раствора S15 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

утрата $KOE = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 7. Консервирующий раствор S7 демонстрировал нормализованную усредненную утрату жизнеспособности 0,35.

Компиляция результатов из примера 5 изложена в таблицах 10 и 11.

Таблица 10

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$4,1 \times 10^{11} \pm 3,8 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{11} \pm 3,44 \times 10^{10}$	$0,18 \pm 0,10$	1
S13	$3,8 \times 10^{11} \pm 4,2 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{11} \pm 2,7 \times 10^{10}$	$0,15 \pm 0,02$	0,85
S14	$3,8 \times 10^{11} \pm 6,1 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11} \pm 3,55 \times 10^{10}$	$0,24 \pm 0,08$	1,35
S15	$4,4 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{11} \pm 6,37 \times 10^{10}$	$0,06 \pm 0,07$	0,35

Таблица 11

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,501 \pm 0,041$	$0,177 \pm 0,008$	0,65
S13	$0,562 \pm 0,101$	$0,247 \pm 0,012$	0,56
S14	$0,465 \pm 0,031$	$0,133 \pm 0,013$	0,71
S15	$0,502 \pm 0,037$	$0,198 \pm 0,016$	0,60

6. Пример 6

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S16, консервирующего раствора S17 или консервирующего раствора S18 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{кратность уменьшения } a_w = (650 - 760) / 650$$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 8.

Компиляция результатов из примера 6 изложена в таблицах 12 и 13.

Таблица 12

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,4 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{11} \pm 4,92 \times 10^{10}$	$0,03 \pm 0,07$	1
S16	$3,6 \times 10^{11} \pm 4,1 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^{11} \pm 9,91 \times 10^{10}$	$-0,07 \pm 0,11$	-2,68
S17	$3,2 \times 10^{11} \pm 4,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11} \pm 5,05 \times 10^{10}$	$0,15 \pm 0,05$	5,57
S18	$2,7 \times 10^{11} \pm 3,9 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{11} \pm 4,76 \times 10^{10}$	$-0,19 \pm 0,06$	-6,98

Таблица 13

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,734 \pm 0,164$	$0,155 \pm 0,003$	0,79
S16	$0,575 \pm 0,862$	$0,136 \pm 0,015$	0,76
S17	$0,742 \pm 0,167$	$0,039 \pm 0,004$	0,95
S18	$0,536 \pm 0,003$	$0,176 \pm 0,029$	0,67

7. Пример 7

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Со ссылкой на фиг. 2, на первой стадии 500 гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1 или консервирующего раствора S19 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. В каждом случае определение общего КОЕ 550 осуществляли после намачивания в консервирующем растворе. На второй стадии 600 гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. В каждом случае измерение активности воды a_w 650 осуществляли на полусухих гранулах с использованием Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., U.S.A.). На третьей стадии 700 полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. В соответствии с одним из вариантов осуществления по настоящему раскрытию, процесс сушки 800 включает по меньшей мере две стадии: стадию 600, которая включает размещение гранул в воздушной сушилке в течение 24 часов при комнатной температуре и для того, чтобы получать полусухие гранулы, и стадию 700, которая включает размещение полусухих гранул в осушителе на 64 часа для того, чтобы получать сухие гранулы. В каждом случае определение общего КОЕ 750 и измерение активности воды a_w 760 осуществляли на сухих гранулах. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, кратность уменьшения a_w вычисляли в соответствии со следующим:

кратность уменьшения $a_w = (650 - 760) / 650$

В каждом случае, и со ссылкой на фиг. 2, утрату жизнеспособности вычисляли в соответствии со следующим:

$$\text{утрата КОЕ} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

В каждом случае вычисляли усредненную утрату жизнеспособности и нормализованную усредненную утрату жизнеспособности в отношении результатов, полученных с использованием консервирующего раствора S1.

Результаты представлены на фиг. 9.

Компиляция результатов из примера 7 изложена в таблицах 14 и 15.

Таблица 14

Образец	Стадия 550	Стадия 750		
	Усредненное КОЕ	Усредненное КОЕ	Усредненная утрата КОЕ ($\log_{10}$)	Нормализованная утрата КОЕ ($\log_{10}$)
S1	$3,5 \times 10^{11} \pm 4,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^{11} \pm 4,13 \times 10^{10}$	$0,03 \pm 0,05$	1
S19	$3,3 \times 10^{11} \pm 2,6 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{11} \pm 2,06 \times 10^{10}$	$0,13 \pm 0,06$	3,83

Таблица 15

Образец	Стадия 650	Стадия 760	
	Усредненное a_w	Усредненное a_w	Кратность уменьшения a_w
S1	$0,660 \pm 0,200$	$0,158 \pm 0,026$	0,76
S19	$0,561 \pm 0,085$	$0,129 \pm 0,010$	0,77

8. Пример 8

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в консервирующий раствор S1, консервирующий раствор S2, консервирующий раствор S3 и консервирующий раствор S4 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты из примера 8 представлены в таблице 16, где все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 16

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель ($\log$)
S1	0,2
S2	0,1
S3	0,1
S4	0

9. Пример 9

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в

консервирующий раствор S1, консервирующий раствор S5, консервирующий раствор S6 и консервирующий раствор S7 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты из примера 9 представлены в таблице 17 и все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 17

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0,2
S5	0,1
S6	0
S7	0,1

10. Пример 10

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S0, консервирующего раствора S8 и консервирующего раствора S9 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты из примера 10 представлены в таблице 18 и все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 18

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0
S0	2,4
S8	0,1
S9	0

11. Пример 11

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S10,

консервирующего раствора S11 и консервирующего раствора S12 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты из примера 11 представлены в таблице 19 и все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 19

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0,1
S10	0,1
S11	0,4
S12	0,2

12. Пример 12

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S13, консервирующего раствора S14 и консервирующего раствора S15 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты из примера 12 представлены в таблице 20 и все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 20

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0
S13	0
S14	0,1
S15	0,1

13. Пример 13

Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1, консервирующего раствора S16, консервирующего раствора S17 и консервирующего раствора S18 при осторожном

перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и

5 фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

10 Результаты из примера 13 представлены в таблице 21 и все протестированные консервирующие растворы давали стабильность штамма в пищевой добавке в течение 4 недель при хранении при 4°C.

Таблица 21

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0
S16	0
S17	0
S18	0,1

14. Пример 14

20 Для каждого консервирующего раствора сушку и тестирование осуществляли по меньшей мере в трех повторениях. Гранулы, полученные как в примере 1, помещали в любой из консервирующего раствора S1 и консервирующего раствора S19 при осторожном перемешивании в течение приблизительно 20 минут. Гранулы после этого помещали на лотковую сушилку в воздушной сушилке при комнатной температуре

25 приблизительно на 24 ч для того, чтобы получать полусухие гранулы. Полусухие гранулы после этого помещали в осушитель приблизительно на 64 ч, в котором продували сухой и фильтрованный воздух. Получали сухие гранулы, имеющие активность воды $a_w \leq 0,3$.

30 В каждом случае, жизнеспособность штамма тестировали в течение периода в четыре (4) недели при условиях хранения при 4°C посредством измерения КОЕ/г высушенных гранул. Тесты осуществляли по меньшей мере в трех повторениях и вычисляли одно стандартное отклонение.

Результаты представлены в таблице 22 и все протестированные консервирующие

35 Таблица 22

Консервирующий раствор	Разность КОЕ/г после 4 недель (log)
S1	0,1
S19	0,1

40 Вкратце, автор настоящего изобретения к удивлению и неожиданно наблюдал, что матрица, содержащая встроенные жизнеспособные *E. coli*, как описано в настоящем документе, способна сохранять жизнеспособность достаточные бактериальных КОЕ в течение заданного периода времени, например, 4 недели, для их коммерческого использования. Например, матрицу успешно встраивали в пеллетированную пищу для животных так, что эту пищу для животных можно хранить/транспортировать/перегружать и в конечном итоге вводить животному, при этом сохраняя достаточно жизнеспособное КОЕ/г корма для животных, чтобы обеспечивать положительный

эффект, в норме связанный с бактериями.

Следует отметить, что заголовки или подзаголовки можно использовать на всем протяжении настоящего раскрытия для удобства читающего, но ни коим образом в качестве ограничения объема изобретения. Кроме того, определенные теории могут
5 быть предложены и описаны в настоящем документе; однако они ни коим образом, будь они верными или ложными, не ограничивают объем изобретения при условии, что изобретение реализуют на практике в соответствии с настоящим раскрытием, не учитывая какую-либо конкретную теорию или схему действия.

Все литературные источники, цитированные на всем протяжении описания, включены,
10 таким образом, посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Специалистам в данной области будет понятно, что на всем протяжении данного описания термин в единственном числе охватывает варианты осуществления, содержащие одно или несколько того, к чему относится термин. Также специалистам в данной области будет понятно, что на всем протяжении данного описания, термин
15 «содержит», который является синонимом «включает» или «отличается с помощью», является инклюзивным или открытым и не исключает дополнительных не указанных элементов или стадий способа.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист
20 в области, к которой относится это изобретение. В случае противоречия данный документ, включающий определения, имеет решающее значение.

Как используют в настоящем раскрытии, термины «около» или «приблизительно» в целом нахождение в пределах погрешности, обычно принятых в данной области. Таким образом, численные количества, приведенные здесь, обычно включают такой
25 предел погрешности, чтобы можно было подразумевать термины «около» или «приблизительно», если не указано в явной форме.

Несмотря на то, что настоящее раскрытие имеет определенные варианты осуществления, описанные в существенных подробностях, вариации и уточнения возможны и будут видны специалистам в данной области в свете данных положений.

(57) Формула изобретения

1. Матрица, содержащая жизнеспособные непатогенные *Escherichia coli* (*E. coli*), встроенные в нее, для обеспечения улучшенных условий консервирования и хранения *E. coli*, причем матрица представлена в форме частицы, которая содержит первый
35 полисахарид, который представляет собой альгинат, частица включает покрытие, содержащее второй полисахарид, который представляет собой мальтодекстрин или декстран, и дисахарид, который представляет собой сахарозу или трегалозу, где указанная матрица имеет a_w и активность воды (a_w) $\leq 0,3$.

2. Матрица по п. 1, где $0,04 \leq a_w \leq 0,3$.

3. Матрица по п. 1 или 2, где указанная матрица имеет соотношение дисахарид/второй полисахарид меньше чем 10, где соотношение представляет собой % масс./% масс.

4. Матрица по п. 3, где соотношение составляет меньше чем 5.

5. Матрица по п. 3, где соотношение составляет приблизительно 1.

6. Матрица по любому одному из пп. 1-5, где указанная матрица дополнительно
45 содержит соль L-глутаминовой кислоты.

7. Матрица по п. 6, в которой указанная соль представляет собой соль натрия и L-глутаминовой кислоты.

8. Способ получения матрицы по любому из пп. 1-7, способ включает:

- смешивание указанной *E. coli* с альгинатом с образованием смеси, образование частиц из указанной смеси и контактирование указанных частиц с консервирующим раствором, содержащим сахарозу или трегалозу и мальтодекстрин или декстран; и

- высушивание указанных частиц для получения указанной активности воды (a_w),

5 при этом сушка включает в себя первую сушку в воздушной сушилке при комнатной температуре в течение около 24 часов и вторую сушку в эксикаторе в течение около 64 часов.

10

15

20

25

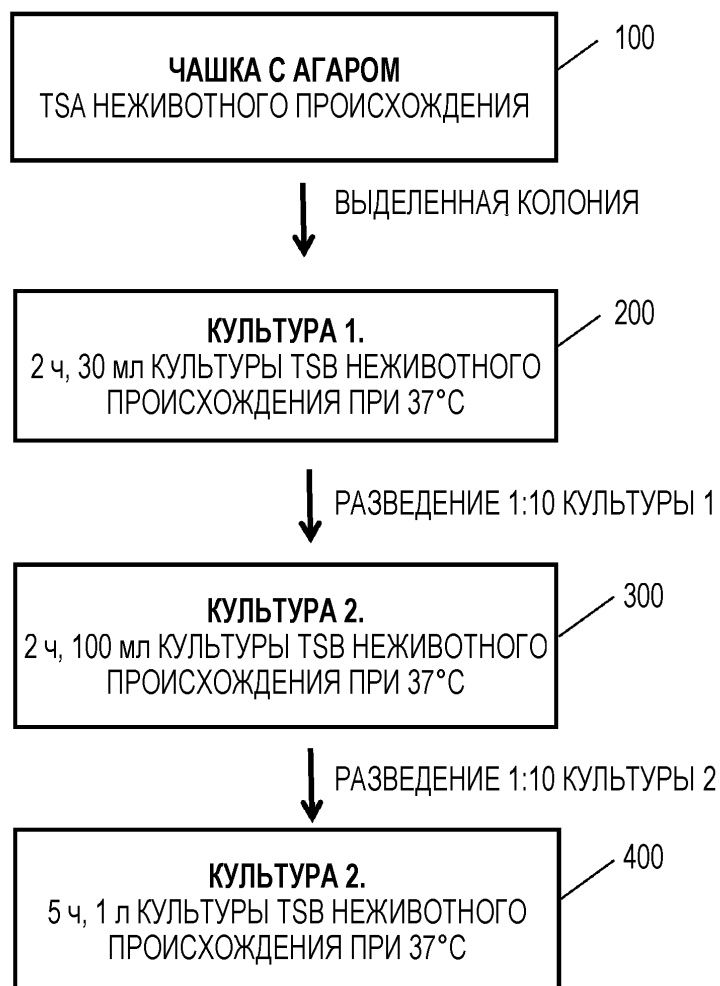
30

35

40

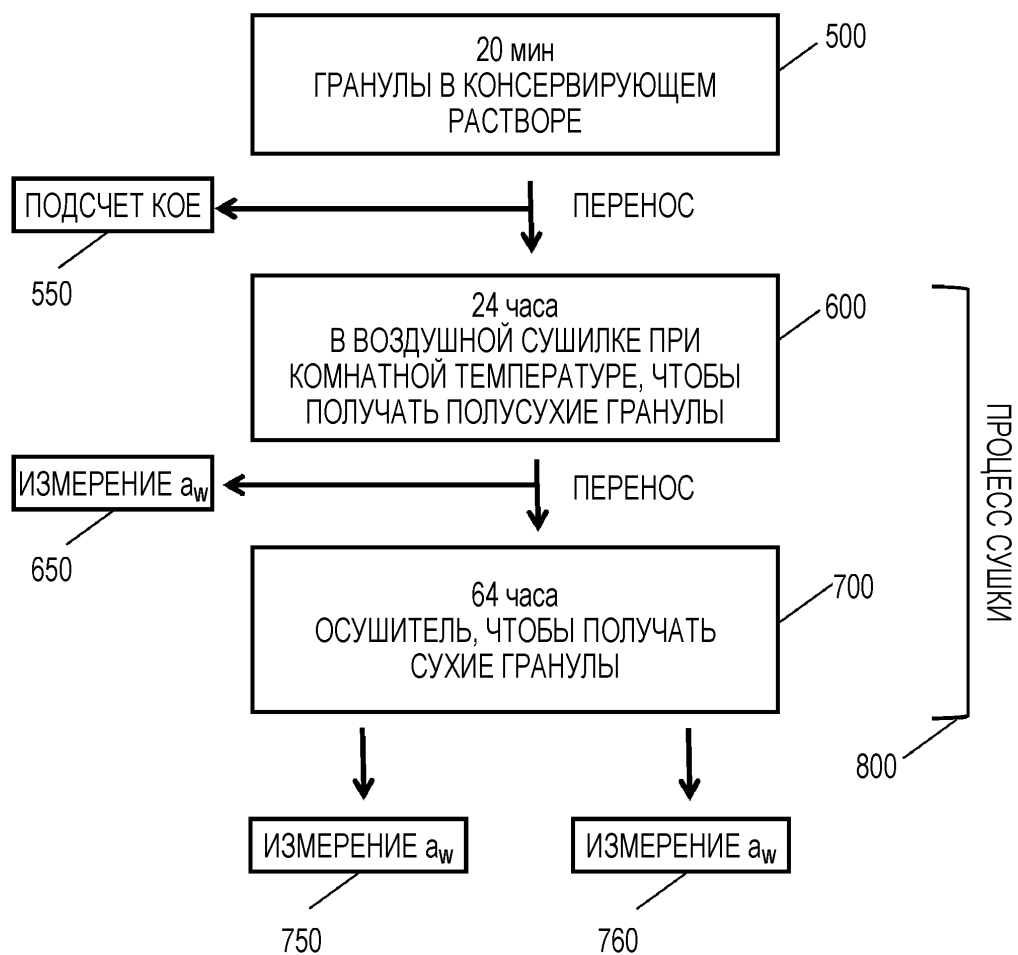
45

1/10



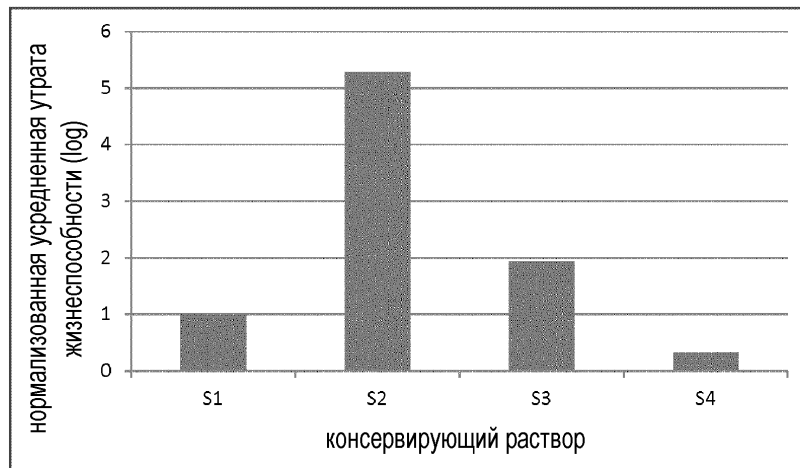
ФИГ.1

2/10



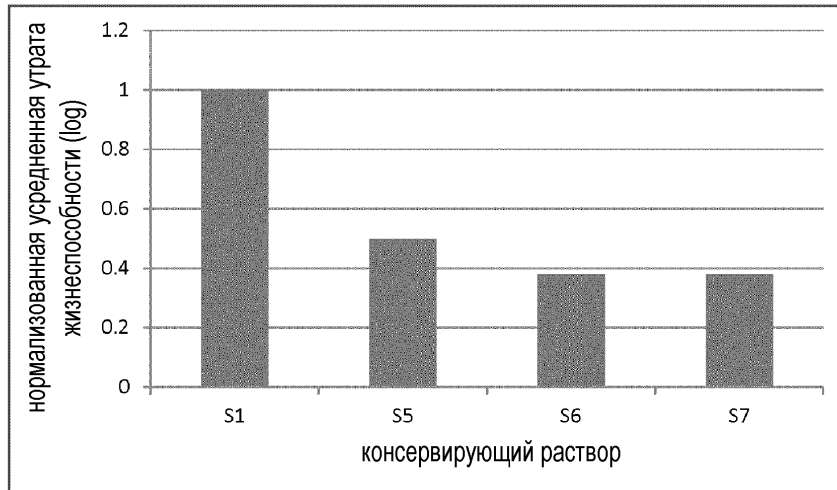
ФИГ.2

3/10



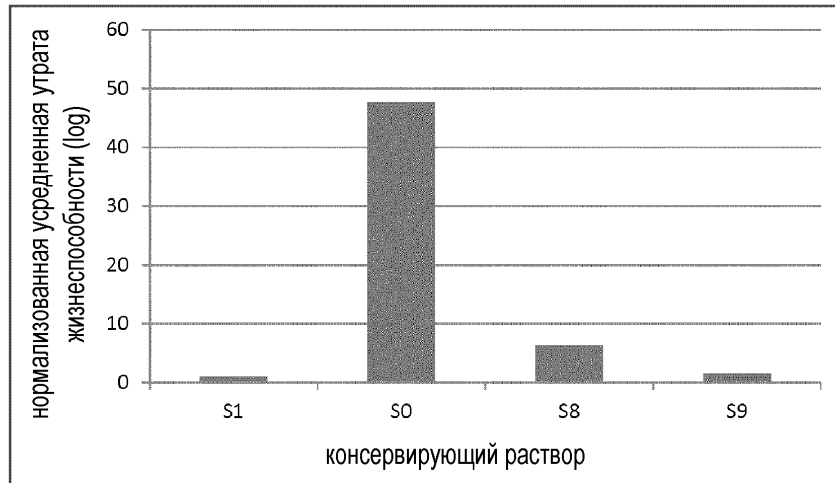
ФИГ.3

4/10



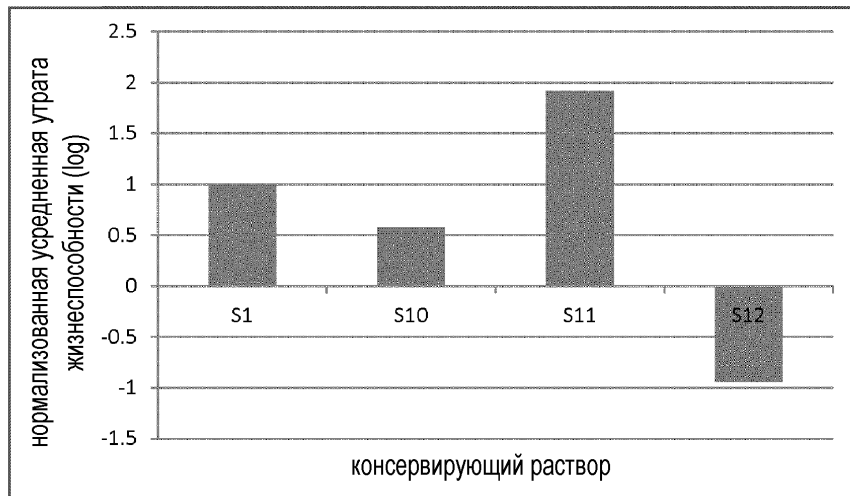
ФИГ.4

5/10



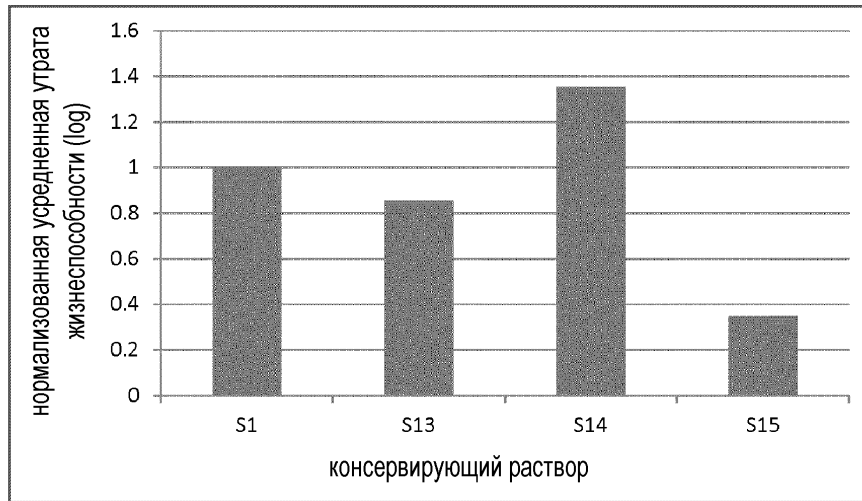
ФИГ.5

6/10



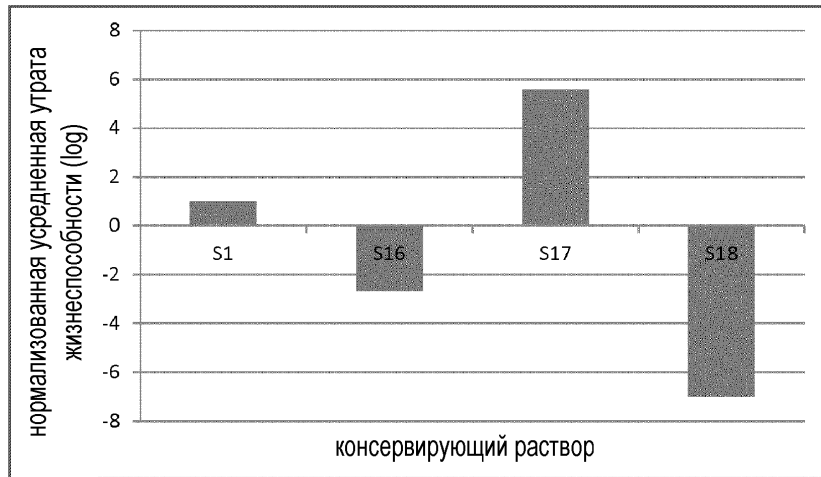
ФИГ.6

7/10



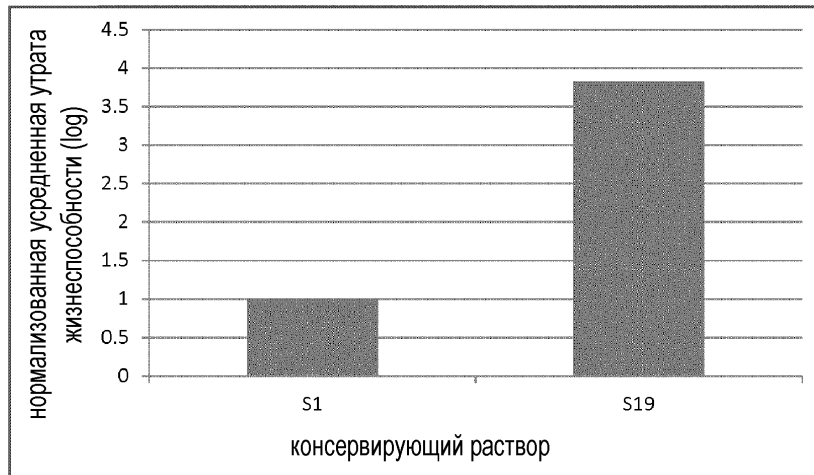
ФИГ.7

8/10



ФИГ.8

9/10



ФИГ.9

10/10

Тест	Код раствора	Репликаты	Сушка			ау		Стабильность по неделям (КОЕ/л)					
			До (КОЕ общее)	После (КОЕ общ.)	Разность (log)	До	После	0	1	2	3	4	
1	S1	A	3.1E+11	1.4E+11	-0.36	0.4502	0.1536	3.4E+09	4.5E+09	4.1E+09	4.4E+09	8.6E+09	
		B	2.1E+11	1.4E+11	-0.17	0.4831	0.1740	3.8E+09	5.4E+09	4.8E+09	3.2E+09	4.8E+09	
		C	3.9E+11	1.4E+11	-0.43	0.4871	0.1671	3.8E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.9E+09	5.5E+09	
	S2	A	2.3E+11	2.8E+09	-1.92	0.2549	0.0616	1.9E+08	9.9E+07	1.3E+08	1.9E+08	3.5E+08	
		B	1.8E+11	8.1E+09	-1.34	0.2836	0.0561	5.4E+08	6.2E+08	4.5E+08	8.2E+08	5.4E+08	
		C	2.9E+11	5.3E+09	-1.74	0.2961	0.0434	3.4E+08	1.1E+08	1.5E+08	2.0E+08	4.6E+08	
	S3	A	2.3E+11	1.0E+11	-0.34	0.4215	0.1274	4.3E+09	1.8E+09	1.5E+09	4.5E+09	4.4E+09	
		B	2.3E+11	2.5E+10	-0.96	0.4011	0.1437	1.1E+09	1.2E+09	1.7E+09	1.5E+09	2.3E+09	
		C	3.1E+11	9.1E+10	-0.53	0.4459	0.1791	3.9E+09	5.9E+09	6.1E+09	3.2E+09	6.1E+09	
	S4	A	2.9E+11	2.4E+11	-0.08	0.4687	0.1376	6.6E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.0E+09	6.3E+09	
		B	2.6E+11	1.6E+11	-0.20	0.4848	0.1429	4.6E+09	4.0E+09	5.3E+09	5.6E+09	4.2E+09	
		C	3.9E+11	3.5E+11	-0.04	0.5114	0.1463	9.7E+09	5.8E+09	6.6E+09	6.2E+09	6.2E+09	
2	S1	A	2.5E+11	1.5E+11	-0.24	0.5219	0.2174	3.7E+09	7.4E+09	5.8E+09	6.6E+09	5.9E+09	
		B	4.3E+11	2.0E+11	-0.34	0.5582	0.2299	5.0E+09	5.0E+09	4.8E+09	6.9E+09	7.7E+09	
		C	3.0E+11	1.9E+11	-0.20	0.5255	0.2416	4.9E+09	5.1E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.9E+09	
	S5	A	3.6E+11	2.0E+11	-0.24	0.5016	0.2470	5.4E+09	1.0E+10	8.3E+09	4.7E+09	6.4E+09	
		B	4.3E+11	2.6E+11	-0.22	0.5011	0.2413	6.5E+09	5.8E+09	6.5E+09	2.8E+09	8.0E+09	
		C	2.8E+11	3.2E+11	0.07	0.5864	0.2592	8.1E+09	7.4E+09	5.6E+09	5.7E+09	9.4E+09	
	S6	A	2.8E+11	4.8E+11	0.23	0.7511	0.2747	1.2E+10	9.4E+09	6.2E+09	8.1E+09	8.8E+09	
		B	3.8E+11	2.5E+11	-0.19	0.5017	0.2539	6.2E+09	5.6E+09	7.1E+09	5.9E+09	7.5E+09	
		C	2.8E+11	1.3E+11	-0.33	0.5065	0.2511	3.3E+09	4.6E+09	7.2E+09	4.7E+09	5.0E+09	
	S7	A	3.3E+11	2.8E+11	-0.07	0.5929	0.2840	7.0E+09	1.0E+10	8.5E+09	6.9E+09	1.0E+10	
		B	3.8E+11	2.6E+11	-0.16	0.5190	0.3027	6.5E+09	8.1E+09	4.8E+09	4.7E+09	8.6E+09	
		C	3.1E+11	2.7E+11	-0.06	0.5104	0.3086	6.6E+09	4.9E+09	4.9E+09	4.4E+09	6.2E+09	
3	S1	A	2.0E+11	1.6E+11	-0.10	0.4418	0.2399	4.5E+09	5.6E+09	2.9E+09	4.1E+09	3.2E+09	
		B	2.5E+11	1.7E+11	-0.17	0.4611	0.2366	4.9E+09	5.4E+09	4.0E+09	5.3E+09	4.6E+09	
		C	2.1E+11	1.8E+11	-0.07	0.4561	0.2468	5.1E+09	5.3E+09	3.1E+09	4.9E+09	4.8E+09	
	S0	A	1.8E+11	2.9E+05	-5.79	0.3066	0.0391	3.8E+04	4.4E+05	3.6E+04	4.7E+05	4.7E+05	
		B	2.1E+11	1.0E+06	-5.31	0.3343	0.0362	1.4E+05	7.1E+05	9.4E+05	2.8E+06	1.5E+08	
		C	1.7E+11	3.2E+06	-4.73	0.3510	0.0356	4.2E+05	8.5E+05	7.2E+05	9.4E+05	3.1E+06	
	S8	A	3.2E+11	4.5E+10	-0.85	0.3631	0.0680	1.5E+09	1.9E+09	3.4E+09	3.2E+09	2.5E+09	
		B	2.3E+11	4.7E+10	-0.69	0.3585	0.0565	1.5E+09	1.1E+09	1.6E+09	2.2E+09	1.9E+09	
		C	3.0E+11	8.6E+10	-0.54	0.3777	0.0614	2.8E+09	1.9E+09	3.0E+09	4.2E+09	3.3E+09	
	S9	A	2.3E+11	1.5E+11	-0.17	0.4625	0.2392	4.5E+09	4.5E+09	3.6E+09	3.8E+09	4.0E+09	
		B	3.0E+11	1.7E+11	-0.25	0.4433	0.2862	4.8E+09	3.9E+09	3.8E+09	4.4E+09	4.5E+09	
		C	1.9E+11	1.4E+11	-0.14	0.4472	0.3011	4.0E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.8E+09	2.9E+09	
4	S1	A	3.1E+11	2.3E+11	-0.14	0.4589	0.1150	5.7E+09	5.8E+09	4.5E+09	5.7E+09	4.9E+09	
		B	3.9E+11	3.0E+11	-0.11	0.4655	0.1267	7.6E+09	6.0E+09	4.5E+09	6.6E+09	4.5E+09	
		C	4.1E+11	3.1E+11	-0.12	0.5011	0.1272	7.8E+09	6.3E+09	4.7E+09	4.6E+09	6.1E+09	
	S10	A	2.9E+11	3.2E+11	0.04	0.4617	0.1279	8.3E+09	6.6E+09	5.6E+09	5.9E+09	6.5E+09	
		B	4.9E+11	3.1E+11	-0.20	0.4977	0.1363	7.6E+09	7.5E+09	6.9E+09	5.9E+09	6.2E+09	
		C	4.2E+11	3.7E+11	-0.06	0.5117	0.1417	9.0E+09	7.8E+09	8.5E+09	6.6E+09	6.3E+09	
	S11	A	2.8E+11	1.8E+11	-0.20	0.4289	0.1567	6.2E+09	3.9E+09	4.1E+09	5.5E+09	3.0E+09	
		B	3.3E+11	1.8E+11	-0.27	0.4003	0.2199	6.2E+09	5.0E+09	4.0E+09	3.1E+09	2.6E+09	
		C	3.6E+11	2.1E+11	-0.24	0.4287	0.2259	7.6E+09	8.1E+09	5.0E+09	6.3E+09	2.4E+09	
	5	S12	A	3.8E+11	6.1E+11	0.20	0.5165	0.1639	1.6E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.1E+10	9.0E+09
			B	4.4E+11	5.5E+11	0.10	0.4994	0.1719	1.5E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	9.7E+09
			C	3.9E+11	4.3E+11	0.04	0.4652	0.1596	1.1E+10	8.6E+09	1.1E+10	7.9E+09	5.2E+09
S1		A	4.5E+11	2.4E+11	-0.28	0.4816	0.1677	5.6E+09	4.5E+09	3.1E+09	5.5E+09	5.0E+09	
		B	3.7E+11	3.1E+11	-0.09	0.5490	0.1824	7.3E+09	6.8E+09	7.0E+09	7.0E+09	7.6E+09	
		C	4.0E+11	2.7E+11	-0.18	0.4739	0.1821	6.1E+09	5.9E+09	6.4E+09	5.5E+09	5.9E+09	
S13		A	3.7E+11	2.5E+11	-0.17	0.6726	0.2386	6.1E+09	5.6E+09	6.2E+09	6.0E+09	6.7E+09	
		B	3.4E+11	2.5E+11	-0.14	0.4740	0.2422	6.1E+09	7.4E+09	5.0E+09	6.8E+09	5.9E+09	
		C	4.2E+11	3.0E+11	-0.15	0.5405	0.2602	7.3E+09	6.3E+09	3.7E+09	7.5E+09	6.3E+09	
S14		A	3.1E+11	2.0E+11	-0.19	0.4778	0.1371	6.5E+09	4.9E+09	3.5E+09	5.3E+09	4.7E+09	
		B	4.2E+11	2.6E+11	-0.20	0.4295	0.1184	8.4E+09	8.6E+09	6.2E+09	6.6E+09	5.0E+09	
		C	4.2E+11	2.0E+11	-0.33	0.4864	0.1434	6.3E+09	8.4E+09	8.2E+09	9.0E+09	6.5E+09	
6	S15	A	4.2E+11	3.5E+11	-0.08	0.5324	0.1938	9.5E+09	8.5E+09	8.3E+09	1.1E+10	8.3E+09	
		B	4.5E+11	3.4E+11	-0.12	0.4612	0.1854	9.5E+09	9.1E+09	8.3E+09	7.9E+09	7.6E+09	
		C	4.5E+11	4.6E+11	0.01	0.5118	0.2164	1.2E+10	9.1E+09	8.9E+09	8.4E+09	7.3E+09	
	S1	A	2.9E+11	2.9E+11	0.00	0.7314	0.1529	7.1E+09	6.5E+09	7.3E+09	6.7E+09	6.7E+09	
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.02	0.8990	0.1590	9.0E+09	8.3E+09	8.9E+09	9.4E+09	8.2E+09	
		C	3.5E+11	2.8E+11	-0.11	0.5714	0.1540	6.9E+09	5.3E+09	5.5E+09	6.8E+09	6.2E+09	
	S16	A	3.5E+11	3.2E+11	-0.04	0.5313	0.1219	8.1E+09	8.9E+09	1.3E+10	1.2E+10	9.0E+09	
		B	4.1E+11	4.9E+11	0.08	0.5198	0.1326	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	1.7E+10	1.2E+10	
		C	3.3E+11	4.9E+11	0.18	0.6745	0.1524	1.3E+10	1.1E+10	9.0E+09	1.3E+10	1.1E+10	
	S17	A	3.0E+11	1.9E+11	-0.21	0.5594	0.0372	5.3E+09	6.5E+09	6.8E+09	5.5E+09	7.3E+09	
		B	3.8E+11	2.9E+11	-0.12	0.9267	0.0439	8.2E+09	8.5E+09	9.8E+09	8.9E+09	1.1E+10	
		C	3.0E+11	2.2E+11	-0.13	0.7010	0.0371	6.5E+09	7.0E+09	5.9E+09	5.8E+09	5.8E+09	
7	S18	A	2.5E+11	3.7E+11	0.17	0.5388	0.1469	9.6E+09	7.9E+09	1.2E+10	7.8E+09	6.3E+09	
		B	3.2E+11	4.4E+11	0.14	0.5327	0.1771	1.1E+10	1.3E+10	8.7E+09	1.1E+10	1.1E+10	
		C	2.5E+11	4.6E+11	0.26	0.5359	0.2048	1.2E+10	1.1E+10	9.4E+09	1.1E+10	9.4E+09	
	S1	A	3.5E+11	3.1E+11	-0.05	0.6498	0.1473	8.1E+09	8.0E+09	-	6.9E+09	5.9E+09	
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.03	0.4659	0.1387	9.7E+09	8.8E+09	-	7.3E+09	-	
		C	3.5E+11	2.9E+11	-0.08	0.8656	0.1871	7.6E+09	9.9E+09	-	9.2E+09	7.9E+09	
	S19	A	3.0E+11	2.5E+11	-0.08	0.6582	0.1401	6.8E+09	5.7E+09	-	4.3E+09	5.7E+09	
		B	3.5E+11	2.6E+11	-0.13	0.5270	0.1194	7.0E+09	7.2E+09	-	5.8E+09	6.0E+09	
		C	3.4E+11	2.2E+11	-0.19	0.4994	0.1280	6.0E+09	5.0E+09	-	4.6E+09	4.5E+09	

ФИГ.10