201809264

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201809264 A

(43)公開日： 中華民國 107 (2018) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：106117960 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 05 月 31 日

(51)Int. Cl.： *C12N1/20 (2006.01)* *A61K35/742 (2015.01)*
A23K10/18 (2016.01) *A01N63/02 (2006.01)*
C12R1/10 (2006.01)

(30)優先權：2016/05/31 歐洲專利局 16172151.9
2016/10/27 歐洲專利局 16196015.8

(71)申請人：德商贏創德固賽有限責任公司 (德國) EVONIK DEGUSSA GMBH (DE)
德國

(72)發明人：派翠 丹尼爾 PETRI, DANIEL (DE)；佩爾澤 斯特凡 PELZER, STEFAN (DE)；克聯柏汀 傑西卡 KLEINBOELTING, JESSICA (DE)；模克 斯特拉 MOLCK, STELLA (DE)；凱普克 麥克 KIPKER, MAIKE (DE)；博格麥爾 克勞迪亞 BORGMEIER, CLAUDIA (DE)；賀伯德 桑德拉 HERBOLD, SANDRA (DE)；墨瑞爾 蓋多 MEURER, GUIDO (DE)；惠蘭 羅斯 WHELAN, ROSE (CA)；多拉里克蘭 DORANALLI, KIRAN (IN)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：0 共 56 頁

(54)名稱

具有益生菌活性之地衣芽孢桿菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）菌株

BACILLUS LICHENIFORMIS STRAIN WITH PROBIOTIC ACTIVITY

(57)摘要

本發明關於具有強產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)抑制作用之新穎地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株及其作為益生菌之用途。

The current invention concerns a new B. licheniformis strain with strong inhibition of C. perfringens and its use as probiotic.

201809264

【發明摘要】

【中文發明名稱】

具有益生菌活性之地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株

【英文發明名稱】

Bacillus licheniformis strain with probiotic activity

【中文】

本發明關於具有強產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)抑制作用之新穎地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株及其作為益生菌之用途。

【英文】

The current invention concerns a new *B. licheniformis* strain with strong inhibition of *C. perfringens* and its use as probiotic.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

具有益生菌活性之地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株

【英文發明名稱】

Bacillus licheniformis strain with probiotic activity

【技術領域】

[0001] 本發明關於具有強產氣莢膜梭菌抑制作用之新穎地衣芽孢桿菌菌株及其作為益生菌之用途。

【先前技術】

[0002] 地衣芽孢桿菌菌株作為飼料工業中之益生菌成分的用途為現有技藝所周知。益生菌(亦稱為“直接餵飼微生物”或“DFM”) 之功能為以積極方式藉由支持有益細菌之生長及/或抑制病原菌生長來影響腸道微生物叢。理想上，藉由使用益生菌而使得使用抗生素生長促進劑(APG)變得多餘。但除此之外，理想上該益生菌還需要實現其他功能，如：幫助消化特定之飼料成分。

[0003] 因此，鑑於現有技術，對於能以積極方式影響腸道微生物叢且除此之外，理想上實現至少一種其他功能之益生菌是有需要的。

【發明內容】

[0004] 令人驚訝地，根據本發明之細菌被發現表現出許多有利之特性。除了其抑制產氣莢膜梭菌(家禽之主要的商業相關病原體)生長之能力外，它們在膽汁之存在下尤其顯示出非常高之增殖率並以非常有效的方式來協助消化纖維素。

[0005] 地衣芽孢桿菌DSM 32314已藉由篩選天然產生之分離菌株而被鑑定出。其已在2016年5月12日根據國際間承認之用於專利程序之微生物寄存的布達佩斯條約的規定，以Evonik Degussa GmbH之名義依先前提及之登錄編號寄存在DSMZ。根據其系統發生和表型特徵，地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314亦可能被分類為副地衣芽孢桿菌(B. paralicheniformis)(s. Dunlap et al. (2015), Int J Syst Evol Microbiol 65, 3487-3492)。

[0006] 因此，本發明之第一個主題為選自下列群組之地衣芽孢桿菌菌株及/或該地衣芽孢桿菌菌株的製劑：

a) 寄存在DSMZ且編號為DSM 32314之地衣芽孢桿菌菌株；

b) 寄存編號DSM 32314之該地衣芽孢桿菌菌株之突變株，該突變株具有該菌株DSM 32314之所有識別特徵，其中該突變株較佳與菌株DSM 32314具有至少95%，較佳至少96、97或98%，更佳至少99或99.5% DNA序列同一性；

c) (a)或(b)之製劑；

d) 含有如(a)、(b)或(c)所含有之代謝產物的有效混合物之製劑。

[0007] 該如寄存在DSMZ且編號為DSM 32314之地衣芽孢桿菌菌株表現出下列表徵序列：

a) 與SEQ ID NO：1之多核苷酸序列具有至少99.5%，尤其100%序列同一性的16S rDNA序列；

b) 與SEQ ID NO：2之多核苷酸序列具有至少99.5%，尤其100%序列同一性之yqfD序列；

c) 與SEQ ID NO：3之多核苷酸序列具有至少99.5%，尤其100%序列同一性之gyrB序列；

d) 與SEQ ID NO：4之多核苷酸序列具有至少99.5%，尤其100%序列同一性之rpoB序列；

e) 與SEQ ID NO：5之多核苷酸序列具有至少99.5%，尤其100%序列同一性之groEL序列。

[0008] 因此，本發明之另一主題為地衣芽孢桿菌菌株或其製劑，尤其是具有如前述特徵之地衣芽孢桿菌菌株，其顯現出至少一種，較佳所有下列特徵：

a) 與SEQ ID NO：1之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，更佳至少99.8或99.9%，尤其100%序列同一性之16S rDNA序列；

b) 與SEQ ID NO：2之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，更佳至少99.8或99.9%，尤其100%序列同一性之yqfD序列；

c) 與SEQ ID NO：3之多核苷酸序列具有至少99%，

較佳至少99.5%，更佳至少99.8或99.9%，尤其100%序列同一性之gyrB序列。

[0009] 較佳地，該地衣芽孢桿菌菌株顯現出至少一種，更佳為所有下列其他特徵：

d) 與SEQ ID NO：4之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，更佳至少99.8或99.9%，尤其100%序列同一性之rpoB序列；

e) 與SEQ ID NO：5之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，更佳至少99.8或99.9%，尤其100%序列同一性之groEL序列。

[0010] 因此，本發明之特定主題還有顯現出下列特徵之地衣芽孢桿菌菌株：

a) SEQ ID NO：1之16S rDNA序列；

b) SEQ ID NO：2之yqfD序列；

c) SEQ ID NO：3之gyrB序列。

[0011] 較佳地，該地衣芽孢桿菌菌株顯現出下列其他特徵：

d) SEQ ID NO：4之rpoB序列；

e) SEQ ID NO：5之groEL序列。

[0012] 較佳地，本發明之菌株係由至少一種，更佳為所有下列其他特性表徵：

[0013] 較佳地，它們能在厭氧條件下生長。此外，較佳地，它們能在該等厭氧條件下降解水不溶性纖維素。

[0014] 較佳地，它們能非常有效地抑制感染性細

菌，尤其產氣莢膜梭菌。特別是，較佳地，它們的特徵在於在孔擴散拮抗分析中，在LBKelly瓊脂盤上對於產氣莢膜梭菌菌株ATCC 13124的病原體清除為至少10 mm，更佳至少13 mm。

[0015] 較佳地，該孢子可在低pH下存活，且較佳地，可在暴露於低至4.0，尤其低至3.0，較佳低至2.0之pH後存活至少1小時。

[0016] 較佳地，根據本發明之菌株的進一步特徵在於能在0.05 重量%醋酸、0.05 重量%丙酸及/或0.2 重量%乳酸之存在下生長。

[0017] 較佳地，它們之進一步特徵在於具有至少200 mU/mL，更佳至少230 mU/mL，尤其約250 mU/mL之纖維素酶活性，至少10 mU/mL，更佳至少15 mU/mL，尤其約20 mU/mL之木聚醣酶活性及/或至少6 mU/mL，更佳至少8 mU/mL，尤其約10 mU/mL之蛋白酶活性。

[0018] 較佳地，根據本發明之地衣芽孢桿菌菌株之進一步特徵在於能在2 mM膽汁，更佳4 mM膽汁之存在下生長。特別是，較佳地，它們的特徵在於在2 mM膽汁之存在下，AUC5性能值(performance value) 為至少0.3，較佳至少0.4，尤其至少0.5，特別約0.54且AUC10性能值為至少1.5，較佳至少1.75，尤其至少2.0，特別約2.1。

[0019] 另外，較佳地，該菌株能在高鹽條件下，特別在10 重量%之NaCl之存在下生長至少一天。

[0020] 此外，較佳地，本發明之菌株可在用於粒化

動物飼料所需之高溫下存活，特別是較佳地，它們可在80℃之溫度下存活至少20分鐘。

[0021] 由於根據本發明之菌株亦可被分類為副地衣芽孢桿菌，本發明之另一主題亦為具有前述特徵之副地衣芽孢桿菌菌株及其製劑。

[0022] 不欲受任何理論束縛，根據本發明之地衣芽孢桿菌菌株被認為藉由多方面作用模式來增進動物健康，包括產生具有選擇性效力之代謝產物及藉由消耗較多之可用營養素來與病原菌競爭，從而抑制病原菌在腸道內有效建立。

[0023] 與抗生素相比較，益生菌之大優勢在於它們不會無差別地破壞細菌亦不會導致具抗生素抗性之病原菌菌株。通常，它們能藉由產生具特定功效之抗微生物物質來選擇性地與病原菌競爭，且理想上能同時增強有益之腸道微生物叢的生長和存活力。此外，較佳地，它們能刺激受治療之動物的全身免疫反應。

[0024] 較佳地，本發明之DSM 32314的突變菌株為自發性突變體。術語“自發性突變體”係指從DSM 32314產生，非有意使用誘變劑之突變體。該等自發性突變體可藉由標準方法取得，諸如將地衣芽孢桿菌菌株在UV光之存在下或容易影響親本菌株的某種抗生素之存在下生長並測試具有提升之生物活性或提升之增進動物之一或多種健康指標的能力的任何抗性突變體。其他用於鑑定自發性突變體之方法為本技藝之一般技術人員所已知。但是除了這些

較佳之自發性突變體外，DSM 32314之所有其他種類的突變體，像藉由遺傳工程處理取得之突變體亦包含在本發明內。

[0025] 本發明之一特定實施態樣為藉由如前述之特性表徵的菌株DSM 32314之非天然產生的突變體。

[0026] 於本發明之一較佳實施態樣中，本發明之菌株和製劑較佳經由口服投予動物或人類。

[0027] 因此，本發明之另一主題為含有本發明之地衣芽孢桿菌菌株及/或製劑之組成物，諸如飼料、食品、飲用水和飼養用水及治療性組成物。

[0028] 本發明還有另一主題為本發明之地衣芽孢桿菌菌株及/或製劑於作為飼料或食品之益生菌成分(DFM)的用途。

[0029] 本發明還有另一主題為地衣芽孢桿菌菌株及/或其製劑於作為飼料或食品之益生菌成分(DFM)的用途。

[0030] 根據本發明之較佳食品為乳製品，特別是優酪乳、乳酪、乳汁、奶油和quark。

[0031] 本發明之菌株的細胞可以孢子(其為休眠的)、營養細胞(其為正在生長)、過渡狀態細胞(其為從生長階段過渡到孢子形成階段)或至少二種形式之組合，特別是有所這些類型之細胞的組合存在，特別是存在於本發明之組成物中。於較佳之實施態樣中，本發明之組成物主要包含或僅包含孢子。

[0032] 當投予動物時，本發明之地衣芽孢桿菌菌株

及含有彼等之組成物較佳增進該等動物之健康及/或改善該等動物之一般身體狀況及/或改善該等動物之飼料轉化率及/或降低該等動物之死亡率及/或增加該等動物之存活率及/或改善該等動物之增重及/或提高該等動物之生產力及/或增加該等動物之疾病抵抗力及/或增加該等動物之免疫反應及/或建立或維持該等動物之健康腸道微生物叢及/或減少通過該等動物糞便泄出病原體。特別是，本發明之菌株和組成物可在投予用於治療目的之抗生素後用於協助重新建立腸道微生物叢之健康平衡。

[0033] 因此，本發明之另一主題為增進動物之健康及/或改善動物之一般身體狀況及/或改善動物之飼料轉化率及/或降低動物之死亡率及/或增加動物之存活率及/或改善動物之增重及/或提高動物之生產力及/或增加動物之疾病抵抗力及/或增強動物之免疫反應及/或建立或維持動物之健康腸道微生物叢及/或減少通過動物糞便泄出病原體的方法，其中係投予動物本發明之菌株及/或製劑或包含該等菌株之本發明的組成物。

[0034] 因此，本發明還有另一主題為本發明之菌株及/或製劑及/或組成物於增進動物之健康及/或改善動物之一般身體狀況及/或改善動物之飼料轉化率及/或降低動物之死亡率及/或增加動物之存活率及/或改善動物之增重及/或提高動物之生產力及/或增加動物之疾病抵抗力及/或增強動物之免疫反應及/或建立或維持動物之健康腸道微生物叢及/或減少通過動物糞便泄出病原體的用途，其中係

投予動物本發明之菌株及/或製劑或包含該等菌株之本發明的組成物。

[0035] 因此，本發明還有另一主題為如前述之本發明之菌株和製劑及含有該等菌株之本發明的組成物，其係用於增進動物之健康及/或改善動物之一般身體狀況及/或改善動物之飼料轉化率及/或降低動物之死亡率及/或增加動物之存活率及/或改善動物之增重及/或提高動物之生產力及/或增加動物之疾病抵抗力及/或增強動物之免疫反應及/或建立或維持動物之健康腸道微生物叢及/或減少通過動物糞便泄出病原體。

[0036] “提高動物之生產力”特別指下列任一者：產生更多或品質更好之蛋、乳汁或肉類或增加斷奶後代之產量。

[0037] 本發明之菌株、製劑和組成物之方法和用途可為治療性或非治療性的。於本發明之一特佳之實施態樣中，該方法和用途為非治療性的，尤其是餵食應用。

[0038] 由於未經處理之動物糞肥因為病原菌及其他成分而可能具有危害環境之作用，尤其是對於動物本身及/或與糞肥接觸之人類，此可藉由餵食動物本發明之菌株、組成物或製劑或直接以本發明之菌株、組成物或製劑處理動物之糞肥或床舖來避免，因此，本發明之另一主題為控制及/或避免糞肥或受污染之液體危害環境之作用的方法，該方法包含將根據本發明之至少一種菌株、一種製劑及/或一種組成物施放在糞肥、受污染之液體、褥墊、

窪坑或糞肥池的步驟。較佳地，該組成物係以液體形式(例如藉由噴霧)，或以粉末形式(例如藉由散播)施用。

[0039] 由於有害細菌可能對褥墊之一致性產生負面影響，尤其是可能影響有一點流體或高流體之褥墊，這可能導致家禽之足墊損傷，此可藉由餵食動物本發明之菌株、組成物或製劑來避免，因此本發明之另一主題為控制及/或改善褥墊之一致性的方法，尤其是確保褥墊之固體一致性的方法及/或避免足墊損傷之方法，該方法包含餵食動物，尤其是家禽根據本發明之至少一種菌株、種製劑及/或一種組成物之步驟。

[0040] 根據本發明之菌株和製劑亦可用於改善水之品質。因此，本發明還有另一主題為控制及/或改善水或水溶液，特別是飲用水及/或飼養用水之品質的方法，其包含將根據本發明之至少一種菌株及/或至少一種製劑及/或至少一種組成物施用於水或水溶液之步驟。

[0041] 此外，根據本發明之菌株和製劑亦可用於治療植物之微生物疾病。因此，本發明還有另一主題為治療及/或預防植物，特別是栽培之植物之微生物疾病的方法，其包含將根據本發明之至少一種菌株及/或至少一種製劑及/或至少一種組成物施用於植物之步驟。該施用可以液體形式，諸如藉由噴霧進行或以固體形式，特別是粉末進行。

[0042] 較佳地，藉由使用本發明之菌株、製劑和組成物實現改善至少一種如上述之特性，其中較佳地，該特

性之實現意指與適當之陰性對照相比較，改善至少1%，更佳至少3%或至少5%。雖然可使用畜牧業領域中已知之陰性對照平均值，但較佳使用接受與受試動物相同處理，但不投予本發明之菌株及/或製劑的陰性對照動物。

[0043] 特別是，可以能有效抑制及/或減少動物腸道中之病原菌生長的本發明之菌株、製劑和組成物的量投予或餵食動物。該等病原菌包括莢膜梭菌、李斯特氏菌(Listeria)、沙門氏菌(Salmonella)、腸球菌(Enterococci)、葡萄球菌(Staphylococci)、產氣單胞菌(Aeromonas)、鏈球菌(Streptococci)、彎曲桿菌(Campylobacter)、大腸桿菌(Escherichia coli)和弧菌(Vibrio)。相對地，本發明之方法可用於減少動物糞便中泄出之病原菌的量。本發明之方法亦可用於維持或增加動物腸道中有益細菌(諸如乳酸菌)之生長。藉由減少病原菌及/或增加或維持有益細菌，本發明之組成物能維持整體健康腸道微生物叢。

[0044] 因此，本發明之另一主題為抑制及/或減少動物腸道中有害細菌或病原菌之生長及/或維持及/或增加有益細菌之生長的方法，其中係將本發明之菌株及/或製劑及/或組成物投予動物且其中該病原菌較佳選自莢膜梭菌屬，特別是產氣莢膜梭菌(C. perfringens)和艱難莢膜梭菌(C. difficile)、李斯特菌屬，特別是產單核細胞李斯特菌(L. monocytogenes)、西爾李斯特菌(L. seeligeri)和威爾斯李斯特菌(L. welshimeri)、沙門氏菌屬，特別是腸道沙門氏菌(S. enterica)、雞沙門氏菌(S. gallinarum)、雞白痢沙

門氏菌(S. pullorum)、亞利桑那沙門氏菌(S. arizonae)、鼠傷寒沙門氏菌(S. typhi mUrium)、腸炎沙門氏菌(S. enteritidis)和邦戈沙門氏菌(S. bongori)、腸球菌屬，特別是糞腸球菌(E. faecalis)、屎腸球菌(E. faecium)和盲腸腸球菌(E. cecorum)、葡萄球菌屬，特別是金黃葡萄球菌(S. aureus)、產氣單胞菌屬、 鏈球菌屬，特別是豬鏈球菌(S. suis)和雞鏈球菌(S. gallinaceus)、彎曲桿菌屬，特別是空腸彎曲桿菌(C. jejuni)和大腸彎曲桿菌(C. coli)、大腸桿菌和弧菌屬，特別是副溶血性弧菌(V. parahemolyticus)和哈氏弧菌(V. harveyi) 且較佳地，該有益細菌係選自乳酸菌，特別是選自乳酸桿菌和雙歧桿菌(Bifidobacteria)。

[0045] 於本發明之一較佳實施態樣中，該至少一種病原菌之量，尤其是產氣莢膜梭菌之量被減少至少0.5 log，更佳減少至少1 log、2 log或3 log。

[0046] 因此，本發明還有另一主題為用於抑制及/或減少動物腸道中病原菌生長及/或維持及/或增加有益細菌生長之本發明的菌株、製劑和組成物，其中該病原菌較佳選自莢膜梭菌屬，尤其產氣莢膜梭菌和艱難莢膜梭菌、李斯特菌屬，特別是產單核細胞李斯特菌、西爾李斯特菌和威爾斯李斯特菌、沙門氏菌屬，特別是腸道沙門氏菌、雞沙門氏菌、雞白痢沙門氏菌、亞利桑那沙門氏菌、鼠傷寒沙門氏菌、腸炎沙門氏菌和邦戈沙門氏菌、腸球菌屬，特別是糞腸球菌、屎腸球菌和盲腸腸球菌、葡萄球菌屬，特別是金黃葡萄球菌、產氣單胞菌屬、鏈球菌屬，特別是豬

鏈球菌和雞鏈球菌、彎曲桿菌屬，特別是空腸彎曲桿菌和大腸彎曲桿菌、大腸桿菌和弧菌屬，特別是副溶血性弧菌和哈氏弧菌，較佳地，該有益細菌係選自乳酸菌，特別是乳酸桿菌和雙歧桿菌。

[0047] 病原菌之出現及/或增加生長確實或可能導致某些疾病爆發。例如產氣莢膜梭菌的出現及/或增加生長可導致家禽之腸道疾病爆發，特別是導致壞死性腸炎爆發。產氣莢膜梭菌之出現及/或增加生長亦可能導致其他疾病，像細菌性腸炎、壞疽性皮炎和結腸性肝炎爆發。即使是由產氣莢膜梭菌造成之最溫和型感染亦可能伴隨腹瀉，導致褥墊潮濕，且由此可能導致繼發性疾病，如足墊皮炎。

[0048] 因此，本發明還有另一主題為包含如前述之本發明的菌株及/或組成物之治療組成物。

[0049] 因此，在此背景下之較佳主題為用於治療及/或預防動物(較佳家禽)之壞死性腸炎，特別是亞臨床壞死性腸炎的治療組成物，該治療組成物包含如前述之本發明的菌株及/或組成物。因此，在此背景下，另一較佳主題為用於治療及/或預防動物(較佳家禽)之細菌性腸炎、壞疽性皮炎、結腸性肝炎、莢膜梭菌病(clostridiosis)、腹瀉及/或足墊皮炎的治療組成物，該治療組成物包含如前述之本發明的菌株及/或組成物。

[0050] 因此，本發明還有另一主題為治療及/或預防家禽之疾病，特別是腸道疾病，較佳壞死性腸炎，特別是

亞臨床壞死性腸炎，其中係投予有需要治療及/或預防疾病之動物本發明之菌株及/或組成物及/或製劑。

因此，本發明還有另一主題為治療及/或預防選自下列群組之疾病，較佳家禽之疾病：細菌性腸炎、壞疽性皮炎、結腸性肝炎、莢膜梭菌病、腹瀉及/或足墊皮炎，其中係投予有需要治療及/或預防疾病之動物本發明之菌株及/或組成物及/或製劑。

[0051] 本發明之菌株及/或製劑及/或組成物可在動物的整個生命期間或在動物生命之特定階段或部分生命期間在飼料及/或飲用水中在數天之間投予動物。例如，該菌株及/或組成物可僅投予在農場動物之起始飲食中或僅投予在已長成之農場動物的飲食中。

[0052] 本發明還有一特定主題為增進人類健康及/或改善人類之一般身體狀況及/或增加人類之疾病抵抗力及/或增加人類之免疫反應及/或建立或維持人類之健康腸道微生物叢的方法，其中係投予人類本發明之菌株及/或製劑，或包含該等菌株之本發明的組成物。

[0053] 因此，本發明還有另一主題為本發明之菌株及/或製劑及/或組成物於增進人類健康及/或改善人類之一般身體狀況及/或增加人類之疾病抵抗力及/或增加人類之免疫反應及/或建立或維持人類之健康腸道微生物叢的用途，其中係投予人類本發明之菌株及/或製劑，或包含該等菌株之本發明的組成物。

[0054] 本發明之組成物，特別是飼料、食品和醫藥

組成物及飲用或飼養用水較佳包含本發明之菌株並以約1×10^3至約2×10^{12} CFU/g飼料或ml水之速率投予動物，尤其以約1×10^3、或約1×10^4、或約1×10^5、或約1×10^6、或約1×10^7、或約1×10^8、或約1×10^9、或約1×10^{10}、或約1×10^{11}、或約1×10^{12} CFU/g飼料或ml水之速率投予動物，較佳以約1×10^4至約1×10^{10}CFU/g飼料或ml水之量，更佳以1×10^4至1×10^7 CFU/g飼料或ml水之量投予動物。

[0055] 相對地，本發明之飼料、食品和水組成物中之本發明的菌株及/或製劑的較佳量較佳為0.1 重量%至10重量%，更佳0.2 重量%至5 重量%，特別是0.3 重量%至3 重量%。

[0056] 本發明之方法可用於所有種類之動物，特別是所有種類之非人和非昆蟲動物，更佳地，所有種類之脊椎動物，諸如哺乳動物、水生動物和鳥類。

[0057] 可受益於本發明之動物包括，但不限於農場動物、寵物、野外動物、動物園動物、水生動物、運動、娛樂或工作用之動物。

[0058] 較佳地，寵物係選自狗、貓、家養鳥類及家養野外動物。

較佳地，水生動物係選自魚類和甲殼類動物，這些水生動物較佳意圖用於人類營養。特別是，這些包括鯉魚、羅非魚、鯰魚、鮪魚、鮭魚、鱒魚、澳洲肺魚(barramundi)、鯛魚、鱸魚、鱈魚、蝦、龍蝦、螃蟹、蝦及小龍蝦。在此背景下，較佳之鮭魚類型為大西洋鮭、紅

鮭、櫻花鉤吻鮭(masu salmon)、帝王鮭、凱塔鮭(keta salmon)、銀鮭(coho salmon)、多瑙河鮭(Danube salmon)、太平洋鮭和粉紅鮭。

[0059] 更佳之水生動物為隨後加工以製成魚粉或魚油之養殖魚。在這方面，較佳地，該魚類為鯡魚、綠鱈(pollack)、步魚(menhaden)、鯷魚、柳葉魚或鱈魚。

[0060] 於更佳之實施態樣中，該動物為被飼養以供食用或作為食物生產者之農場動物，諸如家禽、豬和反芻動物。

該家禽可選自生產性家禽或家養之家禽，但亦可選自觀賞家禽或野禽。

[0061] 在此背景下，較佳之生產性家禽為雞、火雞、鴨和鵝。在此背景下，該生產性牲畜較佳為經優化以生產幼畜之家禽或經優化以提供肉類的家禽。

[0062] 較佳之觀賞家禽或野禽為孔雀、雉雞、鷓鴣、歐石雞、珍珠雞、鵪鶉、雷鳥、松雞、鴿子和天鵝，鵪鶉為特佳者。

[0063] 更佳之家禽為平胸鳥類，特別是鴕鳥和鴯鶓，及鸚鵡。

[0064] 根據本發明之反芻動物較佳選自牛、山羊和綿羊。於一實施態樣中，本發明之組成物可餵食反芻前動物以增進彼等之健康，特別是降低這些動物腹瀉之發生率。反芻前動物為反芻動物，包括年齡從出生到約十二週之犢牛。

[0065] 本發明之組成物可包含至少一種載體或典型之飼料成分或彼等之組合。

[0066] 合適之載體為經添加以提升回收率、功效或物理性質及/或協助包裝和投予之惰性配製成分。該等載體可單獨或組合添加。這些載體可選自抗結塊劑、抗氧化劑、增容劑及/或保護劑。有用之載體的實例包括多醣(特別是澱粉、麥芽糊精、甲基纖維素、樹膠、殼聚醣及/或乳清素)、蛋白質來源(特別是脫脂奶粉及/或甜乳清粉)、肽、糖(特別是乳糖、海藻糖、蔗糖及/或右旋糖)、脂質(特別是卵磷脂、植物油及/或礦物油)、鹽(特別是氯化鈉、碳酸鈉、碳酸鈣、白堊、石灰石、碳酸鎂、磷酸鈉、磷酸鈣、磷酸鎂及/或檸檬酸鈉)和矽酸鹽(特別是黏土，尤其是沸石黏土、無定形二氧化矽、發煙二氧化矽/沉澱之二氧化矽、沸石、富勒土、baylith、clintpolite、蒙脫石、矽藻土、滑石、膨潤土及/或矽酸鹽，如矽酸鋁、矽酸鎂及/或矽酸鈣)。用於動物飼料添加劑之合適載體闡述於每年出版之American Feed Control Officials公司的官方出版物中。參見，例如Official Publication of American Feed Control Officials, Sharon Krebs, editor, 2006 edition, ISBN 1-878341-18-9。載體可在濃縮發酵肉湯之後及/或乾燥期間及/或乾燥之後加入。根據本發明之較佳載體係選自碳酸鈣、矽藻土和植物油。

[0067] 本發明之較佳實施態樣為濃縮物組成物，特別是飼料添加劑組成物，即，適合用於製備飼料組成物之

組成物，其包含至少一種如前述之本發明之菌株和至少一種載體，較佳地，其中該至少一種菌株之含量為0.1至10重量%，更佳0.2至5重量%，特別0.3至3重量%，尤其0.4至2.2重量%，且較佳地，該至少一種載體之含量為至少90重量%，較佳90至99.9重量%，更佳95至99.8重量%，特別97至99.7重量%，尤其97.8至99.6重量%，且較佳地，其中該載體基本上係由石灰石，特別是具有較少部分之矽藻土及/或植物油的石灰石所組成。

[0068] 本發明這些含有穩定化之菌株的較佳組成物可用於飼料和醫藥組成物製劑及飲用和飼養用水，較佳地，這些包含如前述專利說明書中所提及之量的根據本發明之菌株。於一較佳之實施態樣中，每噸飼料、飲用水或飼養用水係使用200至1000克之該等濃縮物組成物，尤其是250、500或1000克該等濃縮物組成物以提供可用於餵養動物之組成物。較佳地，這些濃縮組成物包含至少一種本發明之菌株，其含量為每克該濃縮物組成物包含1×10^{9}至2×10^{11} CFU，特別是2×10^{9}至1×10^{11} CFU之本發明菌株。

[0069] 從這些濃縮組成物開始，飼料和食品組成物可藉由分別將濃縮物組成物與典型之飼料或食物成分混合來製備。

[0070] 可包含在根據本發明之組成物中及/或用於從根據本發明之濃縮物組成物開始製備飼料組成物的合適之典型動物飼料成分包括下列一或多者：蛋白質、碳水化合物、脂肪、其他益生菌、益生元、酶、維生素、免疫調節

劑、乳汁替代物、礦物質、胺基酸、抗球蟲藥(coccidiostat)、以酸為底質之產品及/或藥品，諸如抗生素。

[0071] 可根據本發明使用之含有碳水化合物的組分為，例如牧草、粗飼料、小麥粉、葵花籽粕或大豆粉及彼等之混合物。

[0072] 可根據本發明使用之含有蛋白質的組分為，例如大豆蛋白、豌豆蛋白、小麥麩質或玉米麩質及彼等之混合物。

[0073] 可根據本發明使用之含有脂肪的組分為，特別是動物和植物二種來源之油，如植物油，例如大豆油、菜籽油、葵花籽油、亞麻籽油或棕櫚油、魚油及彼等之混合物。

[0074] 可根據本發明使用之另外含有脂肪之含有蛋白質的組分為，例如魚粉、磷蝦粉、雙殼粉、烏賊粉或蝦殼及彼等之混合物。

[0075] 可根據本發明與本發明之菌株和製劑組合使用之其他益生菌(DFM)較佳選自下列物種之細菌：枯草芽孢桿菌、地衣芽孢桿菌、遲緩芽孢桿菌(Bacillus lentus)、短小芽孢桿菌(Bacillus pumilus)、側孢芽孢桿菌(Bacillus laterosporus)、凝結芽孢桿菌(Bacillus coagulans)、阿列維芽孢桿菌(Bacillus alevi)、蠟樣芽孢桿菌(Bacillus cereus)、栗褐芽孢桿菌(Bacillus badius)、蘇雲金芽孢桿菌(Bacillus thurigiensis)、屎腸球菌(Enterococcus

faecium)和乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)。較佳之實例為枯草芽孢桿菌DSM 32315(如2016年5月12日根據國際間承認之用於專利程序之微生物寄存的布達佩斯條約的規定寄存於DSMZ者)及其衍生物、由Kemin銷售，商標為CLOSTAT®之枯草芽孢桿菌PB6(如美國專利案第7,247,299號中所描述並以ATCC登錄編號PTA-6737寄存者)、由Calpis銷售，商標為CALSPORIN®之枯草芽孢桿菌C-3102(如美國專利案第4,919,936號中所描述並以FERM BP-1096寄存於日本工業科學和技術機構發酵研協會者)、由Chr.Hansen銷售，商標為GalliPro®之枯草芽孢桿菌DSM 17299、由Chr.Hansen銷售，商標為GalliProTect®之枯草芽孢桿菌DSM 17299和地衣芽孢桿菌DSM 17236的混合物、由Chr.Hansen銷售，商標為BIOPLUS2B®之地衣芽孢桿菌和枯草芽孢桿菌孢子的混合物或如美國專利案第6,849,256號中所描述之凝結芽孢桿菌菌株。其他非芽孢桿菌屬益生菌，諸如釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、畢赤酵母(Pichia pastoris)、黑曲黴(Aspergillus niger)、米曲黴(Aspergillus oryzae)或漢遜酵母(Hansenula)亦可用於本發明之組成物中。特別是，可用於食品組成物中之其他已知對人體健康有益的益生菌有，諸如產乳酸菌，特別是乳桿菌或雙歧桿菌。若該其他益生菌未被配製成本發明之組成物的一部分，則其可與本發明之組成物一起投予(無論是同時投予或在不同時間投予)。

[0076] 可根據本發明使用之益生元較佳寡醣，特別

是選自下列群組者：半乳寡醣、唾液酸寡醣、乳果糖、乳蔗糖、果寡醣、帕拉金糖或異麥芽糖寡醣、糖基蔗糖、麥芽寡醣、異麥芽寡醣、環糊精、龍膽寡醣、大豆寡醣、木寡醣、葡聚醣、果膠、多聚半乳糖醛酸聚醣(polygalacturonan)、鼠李半乳糖醛酸聚醣(rhamnogalacturonan)、甘露聚醣、半纖維素、阿拉伯半乳聚醣、阿拉伯聚醣、阿拉伯木聚醣、抗性澱粉、蜜二糖(mehbiose)、殼聚醣、瓊脂糖、菊糖、塔格糖(tagatose)、聚右旋糖及藻酸鹽。

[0077] 可用於根據本發明之飼料組成物中並可協助消化飼料的酶較佳選自植酸酶(EC 3.1 .3.8或3.1.3.26)、木聚醣酶(EC 3.2.1.8)、半乳聚醣酶(EC 3.2.1.89)、半乳糖苷酶，特別是α-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)、蛋白酶(EC 3.4)、磷脂酶，特別是磷脂酶A1(EC 3.1 .1.32)、A2(EC 3.1.1.4)、C(EC 3.1.4.3)和D(EC 3.1.4.4)、溶血磷脂酶(EC 3.1.1.5)、澱粉酶，特別是α-澱粉酶(EC 3.2.1.1)；溶菌酶(lysozyme)(EC 3.2.1.17)、葡聚醣酶(glucanase)，特別是β-葡聚醣酶 (EC 3.2.1.4或EC 3.2.1.6)、葡糖澱粉酶、纖維素酶、果膠酶或彼等之任何混合物。

[0078] 市售之植酸酶(phytase)之實例包括Bio-Feed™植酸酶(Novozymes)、Ronozyme® P和HiPhos™(DSM營養產品公司)、Natuphos™ (BASF)、Finase®和Quantum® Blue(AB Enzymes)、Phyzyme®XP(Verenium/DuPont)及Axtra® PHY(杜邦公司)。其他較佳之植酸酶包括那些描述

於，例如WO 98/28408、WO 00/43503和WO 03/066847中者。

[0079] 市售之木聚醣酶之實例包括Ronozyme®WX和G2(DSM營養產品公司)、Econase®XT和Barley (AB Vista)、Xylathin®(Verenium公司)和Axtra®XB(木聚醣酶/β-葡聚醣酶，杜邦公司)。市售之蛋白酶之實例包括Ronozyme®ProAct(DSM營養產品公司)。

[0080] 可根據本發明使用之維生素為，例如維生素A、維生素D3、維生素E、維生素K，例如維生素K3、維生素B12、生物素、膽鹼、維生素B1、維生素B2、維生素B6、菸酸、葉酸和泛酸，例如Ca-D-泛酸鹽或彼等之組合。

[0081] 可使用之免疫調節劑為，例如抗體、細胞因子、噴霧乾燥之血漿、介白素、或干擾素、或彼等之組合。

[0082] 可根據本發明使用之礦物質為，例如硼、鈷、氯化物、鉻、銅、氟化物、碘、鐵、錳、鉬、硒、鋅、鈣、鎂、鉀、或鈉、或彼等之組合。

[0083] 可根據本發明使用之胺基酸為，例如離胺酸、丙胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸、或色胺酸、或彼等之組合。

[0084] 因此，本發明之進一步的實施態樣為製備動物飼料組成物之方法，其包含將本發明之至少一種菌株及/或至少一種製劑及/或至少一種濃縮物組成物(尤其是能有

效增進動物健康之量)與飼料成分，諸如蛋白質、脂質及/或碳水化合物，及可選擇之其他有益物質(較佳如前述者)混合在一起以提供餵食產品。該方法亦可包含，例如粒化步驟。

[0085] 本技藝之技術熟習人士可使用之已知的標準粒化過程包括乾燥或半濕飼料的擠出加工。較佳之粒化溫度為介於約65℃至約120℃之間。

[0086] 本發明之菌株和組成物可藉由根據本技藝所周知之方法(包括使用描述於例如US 6,060,051、EP0287699或US2014/0010792中之培養基和其他方法)培養本發明之菌株來取得。習知之大規模微生物培養方法包括沈浸發酵(submerged fermentation)、固態發酵或液體表面培養。發酵接近結束時，當營養物耗盡，該菌株之細胞開始從生長階段過渡到孢子形成階段，從而使發酵之終產物主要為孢子、代謝產物及剩餘之發酵培養基。孢子形成為這些菌株之自然生命週期的一部分且通常係由該細胞回應營養限制開始。設置發酵以獲得高水準之地衣芽孢桿菌細胞菌落形成單位並促進孢子形成。培養基中從發酵產生之細菌細胞、孢子和代謝產物可直接使用或藉由習知工業方法，諸如離心、切向流過濾、深層過濾和蒸發進行濃縮。該濃縮之發酵肉湯可，例如經由滲濾過程洗滌以除去殘餘之發酵肉湯和代謝產物。

[0087] 該發酵肉湯或肉湯濃縮物可添加或不添加載體，使用習知之乾燥過程或方法，諸如噴霧乾燥、冷凍乾

燥、托盤乾燥、流化床乾燥、轉鼓式乾燥或蒸發進行乾燥。所產生之乾燥產物可被進一步加工，諸如藉由研磨或粒化，以取得特定之粒度或物理格式。亦可在乾燥後添加如上述之載體。

[0088] 本發明之菌株的製劑可為無細胞製劑或含有細胞碎片之製劑或含有完整細胞和細胞碎片之混合物的製劑。本發明之菌株的無細胞製劑可，例如藉由將發酵肉湯離心及/或過濾來取得。根據所使用之技術，這些無細胞製劑可能並非完全不含細胞，而是可能仍然包含較少量細胞。由於細胞分泌化合物(如代謝產物、酶及/或肽)到周圍培養基中，該細胞之上清液包含該等化合物之混合物，特別是由細胞分泌之代謝產物、酶及/或肽。因此，於本發明之一較佳實施態樣中，該菌株之製劑為發酵肉湯之上清液。

[0089] 包含該菌株之細胞碎片的組成物可藉由應用本技藝之技術熟習人士已知之技術(例如藉由機械裝置或施加高壓)破裂細胞來取得。根據施加之力度，取得僅包含破裂之細胞的組成物或包含細胞碎片和完整細胞之混合物的組成物。細胞均質化可藉由下列方式實現：例如採用弗氏細胞壓碎器(French cell press)、超音波儀、均質器、微射流機(microfluidizer)、球磨機、棒磨機、卵石球磨機、珠磨機、高壓磨輥、立軸式衝擊破碎機、工業混合器、高剪切混合器、槳式攪拌器及/或Polytron勻漿機。合適之替代方式為酶處理及/或化學處理該細胞。

[0090] 本發明之無細胞製劑亦包含藉由先應用如前述之技術破裂細胞，隨後移除細胞碎片和剩餘之完整細胞來取得之製劑。移除細胞碎片和剩餘之完整細胞可藉由，特別是，離心及/或過濾進行。

[0091] 本發明之菌株的製劑可包含至少一種代謝產物，較佳代謝產物之混合物(如下文中進一步描述者)及/或至少一種選自蛋白酶，尤其是地衣素(lichenisin)、木聚醣酶及/或纖維素酶之酶及/或至少一種肽，及/或彼等之組合作為活性化合物。

[0092] 含有如本發明之菌株中所包含及/或如前述之細胞製劑中所包含之代謝產物的有效混合物之製劑可，例如根據美國專利案第6,060,051號中闡明之方法取得。特別是，該製劑可藉由使用有機溶劑(如醋酸乙酯)將如包含在前述之製劑中的代謝產物沉澱下，隨後再將該沉澱之代謝產物重新溶解在適當之溶劑中來取得。接著可藉由尺寸排阻過濾法來純化該代謝產物，該尺寸排阻過濾法可基於分子量截斷來將代謝產物分成不同餾分之組別。

[0093] 含有本發明之代謝產物的有效混合物之製劑較佳包含本發明菌株之至少5種，更佳至少6種、7種、8種、或9種，特別是所有代謝產物。菌株DSM 32314之代謝產物含量描述於表5.1中。該代謝產物較佳具有介於400至3000道耳吞之間，更佳為介於450至2500道耳吞之間的分子量。

[0094] 較佳地，根據本發明，本發明之實施態樣中

總是使用有效量之本發明的菌株及/或製劑及/或組成物。術語“有效量”係指與未經投予本發明之菌株及/或製劑及/或組成物，但經投予除此之外的相同飲食(包括飼料和其他化合物)之動物相比較，能使至少一種對動物及/或環境有益之效果(特別是與前文已提及之特性相關者)生效的量。

[0095] 在治療應用之情況中，較佳使用本發明之菌株及/或製劑及/或組成物之治療量。術語“治療量”係指足以改善、逆轉或預防動物之疾病狀態的量。各種動物之最佳劑量水準可由本技藝之技術熟習人士藉由評估，尤其是，該組成物之下列能力而輕易地測定：(i)以各種劑量抑制或減少腸道病原菌，(ii)增加或維持有益細菌之水準及/或(iii)以各種劑量增進動物健康。

【實施方式】

實施例1.與在胃腸道中存活相關之菌株特性。

[0096] 從各種環境樣品中篩選地衣芽孢桿菌菌株以取得作為動物直接餵飼微生物(DFM)/益生菌之優良菌株。由於菌株意圖在靶的動物之腸道內充分發揮潛力，預先篩選該菌株以經受各種環境和腸道相關狀況。產生菌株孢子(Nicholson and Setlow 1990)、洗滌並在80℃溫育20分鐘(巴氏滅菌)，然後使用小牛肉浸湯瓊脂(VI，Difco™，編號234420，Becton Dickinson公司，德國海德堡)在10倍對數稀釋/L進行滴定。將沒有生長之前的第二高稀釋液儲存

於-80℃並作為所有從孢子狀態開始之進一步評估的標準化起點。為了模擬胃通道(Argenzio 2004a； Trampel and Duke 2004)，根據Larsen et al. (2014)評估暴露於酸之存活情形。在指示在胃/前胃(proventriculus)和肫(gizzard)之條件下生長的低pH下及存在高達4 mM膽汁之pH 7下(B8631，CAS 8008-63-8，Sigma-Aldrich公司)進一步評估營養細胞之生長以確認菌株在胃或肫廓清後不久在小腸近端部分的生長(Argenzio 2004b； Trampel and Duke 2004)。藉由將標準化孢子溶液在厭氧條件(AnaeroPak™, Thermo Fisher Scientific)下接種在補充有2.5 mM KNO_3之VI培養基(Glaseret al. ,1995)中來評估菌株在厭氧小腸(Argenzio 2004b； Trampel and Duke 2004)中之適合性。此外，在補充有1%脫脂奶粉(70166，Sigma-Aldrich公司)或0.1%水不溶性AZCL-HE纖維素性(I-AZCEL，Megazyme國際公司，愛爾蘭Bray市)之VI 瓊脂盤上評估菌株之厭氧蛋白水解和纖維素分解活性。滲透壓力(如亦在腸道中發現者)(Argenzio 2004b； Trampel and Duke 2004) 係藉由在添加5% NaCl之VI瓊脂(den Besten et al. 2009) 上測定生長來進行評估。最後，藉由將孢子暴露於99℃，20分鐘(Palop et al. 1996)且隨後接種在VI瓊脂上來評估孢子之熱穩定性，以測定粒化穩定性。地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314在模擬之胃通道中存活，菌株DSM 32314在pH6開始觀察到生長。菌株DSM 32314可厭氧生長且能在厭氧條件下降解水不溶性纖維素。菌株DSM 32314能在2和4 mM膽

汁之存在下及10% NaCl之存在下生長。菌株DSM 32314達到4.35×10^9 CFU/mL之平均孢子計數，且菌株DSM 32314之孢子在暴露於99℃，20分鐘後能存活。此外，地衣芽孢桿菌野生型菌株WT1和 WT2經評估可厭氧生長並經受pH 6之環境，但它們無法厭氧降解纖維素，因此不符合作為DFM/益生菌候選者之資格。然而，它們可作為下列實施例中之野生型比較。

參考文獻：

Argenzio, R. A. (2004a). Secretion of the Stomach and Accessory Glands, p. 405 – 418. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 25; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 – 437. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H.; Jones, K. M. (1986). Data for Biochemical Research; 3rd edition, Oxford Science Publishing, United Kingdom.

Den Besten HMW, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. (2009). Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. Appl Environ Microbiol. 75:4111–9.

Glaser, P., A. Danchin, F. Kunst, P. Zuber, and M. M. Nakano. (1995). Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177:1112–1115

Nicholson W. L., Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood C R, Cutting S M, editors. Molecular biological methods for *Bacillus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.; 1990. pp. 27–74.

Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenized foods. International Journal of Food Microbiology 29, 1-10.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 – 500. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

實施例2.比較菌株相對於野生型地衣芽孢桿菌之性能-膽汁耐受性之定量評估。

[0097] 為了評估選自實施例1之地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314的競爭性，進行與代表性地衣芽孢桿菌野生型1(WT1)和野生型2(WT2)比較之分析並藉由在添加2 mM膽汁之VIB培養基中生長菌株來測定菌株在緊接在胃通道(Argenzio 2004b； Trampel and Duke 2004)後之近端小腸中，在中性pH之膽汁的存在下的性能狀態。將在100mL錐形瓶中之具有50μL候選菌株細胞懸浮液與10mL VIB的隔夜培養物在37℃和200rpm下培育，然後將約50μL之隔夜培養物轉移到具有1mL VIB，pH 7和2 mM膽汁之100孔蜂窩板(Oy Growth Curves Ab有限公司，前Thermo Labsystems，芬蘭赫爾辛基)中，以取得每mL之OD為0.2。觀察菌株在37℃和200rpm下之特異性生長48小時，每15分鐘使用Bioscreeen C MBR與BioLink軟體包(Oy Growth Curves Ab 有限公司)測定OD。計算曲線下面積(AUC)之前，將各時間點之每一培養的讀值減去僅具有膽汁之肉湯(空白組)的一式三份空白OD之平均讀值。以介於0-5h之曲線下面積(AUC5，ODx時間(以h計))、0-10h之曲線下面積(AUC10，ODx時間(以h計)) 及菌株達到其最大光密度之時間(Tmax(以h計))比較各菌株之定量評估。使用Minitab®16統計軟體(Minitab公司，美國賓州州立學院)之單因素ANOVA方法進行統計分析。結果可在表2.1中找到。

表2.1.在2mM膽汁之存在下，地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314和野生型菌株WT1和WT2之生長。

菌株 ID	AUC5	AUC10	Tmax
DSM 32314	0.539 [A]	2.144 [A]	18.2 [C]
WT1	0.266 [B]	0.714 [B]	30.3 [B]
WT2	0.378 [B]	1.177 [B]	36.4 [A]
P 值	*P < 0.01*	*P = 0.001*	*P < 0.001*
SEM	0.018	0.076	0.5

AUC5，介於時間點0和5h之間的曲線下面積，為OD × h；AUC10，介於時間點0和10h之間的曲線下面積，為OD × h；Tmax，以h計之達到最大光密度的時間；SEM，平均值之合併標準差；不同字母之[A、B]平均值為統計上顯著不同。

[0098] 在直接比較中，在2mM膽汁之存在下，菌株DSM 32314較野生型地衣芽孢桿菌菌株WT1和WT2快10小時達到其最大OD。另外，菌株DSM 32314在測試之前5小時和前10小時之期間內分別較野生型地衣芽孢桿菌菌株之生長速度快1.4-2.0倍和1.8-3.0倍。

參考文獻：

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 – 437. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 – 500. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

實施例3.比較菌株相對於現有技術之用於動物營養的直接餵飼微生物(DFM)/益生菌之性能-在短鏈脂肪酸(SCFA)之

存在下生長。

[0099] 在短鏈脂肪酸之存在下評估菌株DSM 32314和WT1之生長比較，因為該等短鏈脂肪酸在腸道中被觀察到對大腸之重要性日益增加(Argenzio 2004b；Trampel and Duke 2004)。使用如實施例1中描述之標準化的孢子溶液開始試驗，在37℃和pH 6下，測試需氧菌在VI培養基中之生長情況，讀出參數為生長相對於不生長。為了進行此測試，使用McIlvaine緩衝液(Palop et al. 1996)將VI培養基調整為pH6，隨後補充以0.05%醋酸(HA，537020，CAS 64-19-7，Sigma-Aldrich公司)、0.05%丙酸(HP，P1386，CAS 79-09-4，Sigma-Aldrich公司)或0.2%乳酸(HL，W261106，CAS 50-21-5，Sigma-Aldrich公司)。結果可在表3.1中找到。

表3.1.評估地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314和野生型菌株WT1在pH 6，短鏈脂肪酸之存在下的生長情況。

菌株ID	醋酸	丙酸	乳酸
DSM 32314	是	是	是
WT1	無生長	無生長	無生長

[0100] 地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314能在pH 6，醋酸、丙酸和乳酸之存在下生長，而WT1菌株無法在這些條件下從孢子階段生長。

參考文獻：

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 – 437. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenized foods. International Journal of Food Microbiology 29, 1-10.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 – 500. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

實施例4比較菌株相對於現有技術之用於動物營養的直接餵飼微生物(DFM)/益生菌之性能-酶活性之定量評估。

[0101] 類似於實施例2中進行之試驗，評估各別需氧菌之纖維分解、木聚醣分解和蛋白水解活性以比較菌株DSM 32314、WT1和WT2。依Larsen et al.(2014)中之描述測定纖維素酶和木聚醣酶活性。在蛋白水解活性分析方面，依前述將菌株之起始和主要培養在37℃下，生長在VIB中。從主培養物取出10μL，將其加入20μL之0.5%異硫氰酸螢光素酪蛋白(FITC；C3777，Sigma-Aldrich公司)溶液與20μL緩衝液中，該緩衝液係由20mM磷酸鈉(二鹽基的，無水)與150mM氯化鈉(所有組分均來自Sigma-Aldrich)所組成，然後在37℃下培育1小時。加入150μL之10%(v/v)三氯醋酸(Sigma-Aldrich公司)並在37℃下再培育30分鐘後，將樣品在19,000rpm離心15分鐘，然後將2μL上清液轉移到200μL之500mM TRIS HCl溶液(Trizma BaseTRIS，Sigma-Aldrich公司)中。在激發波長494nm，

發射波長518 nm處測定由於蛋白水解釋出之可溶性肽的螢光(TECAN GENios Microplate Reader, Tecan集團有限公司，瑞士Männedorf)。在三個獨立運作中進行分析，然後取每μL溶液之毫單位的平均值，使用Minitab®16統計軟體(Minitab公司，美國賓州州立學院)之單因素ANOVA方法進行統計分析。結果可在表4.1中找到。

表4.1.與野生型菌株WT1和WT2相比較之地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314的纖維素酶、蛋白酶和木聚醣酶活性。

菌株ID	纖維素酶活性 (mU/mL)	蛋白酶活性 (mU/mL)	木聚醣酶活性 (mU/mL)
DSM 32314	250.3 A	9.8 A	20.5 A
WT1	n/d	3.3 B	14.3 B
WT2	56.6 B	2.7 B	14.6 B
P值	P < 0.001	P < 0.005	P < 0.001
SEM	15.3	1.8	0.8

SEM，平均值之合併標準差；不同字母之A、B平均值為統計上顯著不同。

[0102] 在直接比較中，菌株DSM 32314顯示出與WT2相比較，纖維素酶活性顯著增加4.4倍。此外，菌株DSM 32314顯示出與WT1相比較，蛋白酶活性顯著增加3.0倍，而與WT2相比較，蛋白酶活性顯著增加3.6倍。此外，與WT1和WT2相比較，菌株DSM 32314顯示出木聚醣酶活性顯著增加1.4倍。

參考文獻：

Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E. N., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, M. D., Nielsen, B., Brockmann, E., Derkx, E. M. F. and Jespersen, L. (2014). Characterization of Bacillus spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. Applied microbiology and biotechnology, 98(3), 1105-1118.

實施例5.比較菌株相對於現有技術之用於動物營養的直接

餵飼微生物(DFM)/益生菌之性能-代謝產物之表現和病原體抑制作用。

[0103] 類似於實施例2中進行之試驗，評估在各別培養基中表現之代謝產物和受抑制之病原體的各別數目以比較地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314、WT1和WT2。在代謝產物表現分析方面，依Scholz等人(2011年)之描述生長起始培養物並進行試驗。從在37℃和160rpm下，在100mL燒瓶中生長24小時之10mL Luria Bertami肉湯(LB，Thermo Fisher科技)培養物取出100μL並轉移至主培養物中。將主培養物在10mL之含有0.2mL/L KellyT微量金屬溶液(LBKelly,Scholzet al. 2011)的LB或10mL之具有0.6%酵母萃取物(Y1625，CAS 8013-1-2，Sigma-Aldrich公司；所產生之肉湯縮寫為TSBYE) 的胰蛋白酶大豆肉湯(Oxoid公司，Thermo Fisher Scientific)中生長，二者均係在100mL燒瓶中，在37℃，160rpm下生長24小時。將4mL之主培養物與2mL之正丁醇在15mL試管中合併，震盪混合3分鐘，然後超音波處理15分鐘。在5000rpm離心1分鐘後，轉移有機相，真空乾燥之並使用高性能液相色層分析法-電噴霧離子化質譜法(HPLC-ESI-MS；Chen等人2006)進行分析。每個樣品以二種不同模式，負和正模式進行測量並取得質譜。將所產生之類似於Teo和Tan(2005)中報告的波峰轉換成以Da表示之分子質量。比較之結果可在表5.1中找到。

表5.1.由菌株DSM 32314、WT1和WT2分別表現在LBKelly中之代謝產物的比較。

分子量 →	496 Da	389 Da	855 Da	865 Da	943 Da	969 Da	1008 Da	1022 Da	1036 Da	1050 Da	1420 Da	1423 Da	2471 Da
DSM 32143	是	n/d	是	n/d	n/d	是	是	是	是	是	是	是	是
WT1	n/d	是	n/d	是	是	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
WT2	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	是	是	微量	n/d	n/d	n/d	n/d

[0104] 此外，使用孔擴散拮抗試驗(Parente et al. 1995)評估經由製造地衣芽孢桿菌細菌素(為來自表5.1之代謝產物的一部分，但未經深入研究)來抑制產氣莢膜梭菌。測試的四個致病性產氣莢膜梭菌候選者為來自Teo and Tan (2005) 之產氣莢膜梭菌菌株ATCC 13124型及三個從德國波茨坦萊比錫大學獸醫學院細菌學和真菌學教授Christoph Baums博士取得之自家禽和豬分離出的致病性產氣莢膜梭菌原野分離株。來自萊比錫之產氣莢膜梭菌A型菌株之描述如下：菌株2300-1-17和2300-1-18係從壞死性腸炎陽性雞之消化道分離出。二種菌株均產生α毒素，菌株2300-1-17亦表現NetB毒素(Savva et al. 2013； Uzal et al. 2014)，而菌株2300-1-18之β2毒素測試為陽性(Allaart et al. 2012)。菌株2300-1-19係從顯示出A型梭菌腸炎症狀之腹瀉仔豬的消化道中分離出(Songer and Uzal 2005)。生長條件和培養基為Teo and Tan (2005)所描述者。簡單地說，將芽孢桿菌菌株在37℃和160rpm，5%CO_2大氣下，分別生長在100mL燒瓶中之10mL TSBYE和LBKelly起始培養中24小時。將產氣莢膜梭菌起始培養物以厭氧方式(AnaeroPak™，Thermo Fischer科學公司)在37℃和160rpm下，在100mL燒瓶中之流體巯基醋酸鹽肉湯(FTB，Becton Dickenson)中培養24小時，然後以無菌棉籤塗佈在瓊脂盤上(具有1%瓊脂之TSBYE，短TSAYE)。然後將經接種之TSAYE盤在37℃下厭氧培育整夜，以取得整片產氣莢膜梭菌。隔夜生長之後，在鋪有產氣莢膜梭菌之瓊脂中切出三

個直徑為9 mm之孔，使用第1個孔作為不需培養之未經接種的對照組，在第2個孔中接種100μL之非產氣莢膜梭菌抑制性芽孢桿菌菌株(蠟狀芽孢桿菌toyoi變種，NCIMB 40112)，第3個孔中接種100μL之地衣芽孢桿菌DSM 32314或DSM 17299起始培養物。在37℃下培育24小時後，測量從切割孔之邊緣開始到透明區之邊界以測定透明區域(以mm計)，每一株落測量二次(水平，垂直)，然後將其平均。在每一地衣芽孢桿菌拮抗作用試驗和培養基方面，以一式二份之盤運作來進行分析。使用Minitab®16統計軟體(Minitab公司，美國賓州州立學院)之單因素ANOVA方法進行統計分析，使用Fisher LSD來用於平均分隔。表5.2中可找到病原體(生長在LBKelly之菌株)的抑制結果，表5.3中可找到病原體(生長在TSBYE之菌株)的抑制結果。

表5.2.比較地衣芽孢桿菌DSM 32314和DSM 17299在致病性產氣莢膜梭菌孔擴散分析(生長在LBKelly之菌株)中之抑制能力，數值係以mm病原體清除表示。

致病性產氣莢膜梭菌→ 芽孢桿菌↓	家禽壞死性腸炎菌株 2300-1-17	家禽壞死性腸炎菌株 2300-1-18	豬梭菌性腸炎菌株 2300-1-19	ATCC 13124型菌株	平均抑制
DSM 32314	15.50	11.50	14.50	14.00	13,88 ^{A}
DSM 17299	2.00	0.00	6.00	2.00	2.50 ^{B}
*P*值					*< 0.001*
SEM					2.15

SEM，平均值之合併標準差；不同字母之^{A,B}平均值為統計上顯著不同。

表5.3比較地衣芽孢桿菌DSM 32314和DSM 17299在致病性產氣莢膜梭菌孔擴散拮抗分析(生長在TSBYE之菌株)中之抑制能力，數值以mm病原體清除表示。

致病性產氣莢膜梭菌→ 芽孢桿菌↓	家禽壞死性腸炎菌株 2300-1-17	家禽壞死性腸炎菌株 2300-1-18	豬梭菌性腸炎菌株 2300-1-19	ATCC 13124型菌株	平均抑制
DSM 32314	21.00	17.00	21.00	18.00	19.25 ^{A}
DSM 17299	0.00	0.00	0.00	0.00	0,00 ^{B}
*P*值					*< 0.001*
SEM					1.46

SEM，平均值之合併標準差；不同字母之^{A,B}平均值為統計上顯著不同。

參考文獻：

Allaart, J. G., de Bruijn, N. D., van Asten, A. J., Fabri, T. H., and Gröne, A. (2012). NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. Avian Pathol., 41:541-546

Chen, X. H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. and Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. Journal of bacteriology, 188(11), 4024-4036.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. Journal of microbiological methods, 22(1), 95-108.

Savva, G. S., Fernandes da Costa, S. P., Bokori-Brown, M., Naylor, C. E., Cole, A. R., Moss, D. S., Titball, R- W., and Basak, A. 2013. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. J Biol. Chem., 288: 3512-3522.

Scholz, R., Molohon, K. J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A. L., Süssmuth, R. D., Mitchell, D. A. and Borriss, R. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Journal of bacteriology, 193(1), 215-224.

Songer, J. G., and Uzal, F. A. (2005). Clostridial enteric infections in pigs. Journal of veterinary diagnostic investigation, 17(6), 528-536.

Teo, A. Y.-L. and Tan, H.-M. (2005). Inhibition of Clostridium perfringens by a novel strain of *Bacillus licheniformis* from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. Appl. Environm. Microbiol., 71:4185-90.

Uzal, F. A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, J. R., Garcia J., Awad, M. M., Adams, V., Moore, R. J., Rood, J. I., and McClane, B. A. (2014). Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiol., 9:361-377

實施例6.在印度飼養之餵食新穎地衣芽孢桿菌或抗生素生長促進劑的肉仔雞性能之比較。

[0105] 以置於具有使用過之褥墊的地面雞圈中之日齡，雄性Vencobb 400小雞 (Venkateshwara Hatcheries Pvt.有限公司，印度)進行肉仔雞生長性能研究。隨機分配三種飲食治療，每一治療複製18個雞圈，每個雞圈含有25隻雞。以三個階段之飲食治療的其中一者餵食小雞，該三個階段包含小雞飲食(1-14天)、生長飲食(15-28天)和大肉

雞飲食(29-42天)階段。該基礎飲食主要是以玉米-大豆粉為底質(表6.1)，含有500g/MT之二硝甲苯甲醯胺(dinotolmide)以控制球蟲病。基礎飲食亦包括4%肉和骨粉(MBM)作為額外的挑戰，因為MBM為肉仔雞發展出由產氣莢膜梭菌引起之壞死性腸炎的誘發因素(M'Sadeqa et al. 2015)。三種飲食治療主要以玉米-大豆粉(表6.1)為底質且包括：1.基礎對照飲食(對照飲食組)，2.對照飲食+50g雙水楊酸伸甲基桿菌肽(Bacitracin Methylene Disalicyclate)/MT飼料(BMD)，3.對照飲食+250g地衣芽孢桿菌菌株DSM 32314/MT飼料(含有2.0*109 cfu/g)(DSM 32314)。實驗療法係在1-42天齡自由採食糊狀之飼料。使用單因素ANOVA方法進行統計分析並以SAS vs9.4 (SAS Institute Inc.，美國)進行LSD試驗後分析。治療對體重、飼料轉化率和死亡率影響的結果報告於表6.2中。

表6.1.用於小雞成長及大肉雞階段之基礎飲食和飲食營養組成。

成分,%	小雞飲食 (1-14 d)	生長飲食 (15-28 d)	大肉雞飲食 (29-42 d)
玉米	53.98	62.27	64.54
大豆粉,48%蛋白	36.09	27.64	24.63
肉和骨粉	4.00	4.00	4.00
大豆油	2.46	2.60	3.60
磷酸二鈣	1.48	1.51	1.53
石灰石	0.39	0.45	0.16
預混物(包含維生素-礦物質混合物)	0.65	0.65	0.65
氯化鈉	0.28	0.29	0.29
碳酸氫鈉	0.10	0.10	0.10
氯化膽鹼50	0.10	0.10	0.10
DL-蛋胺酸	0.29	0.23	0.22
L-離胺酸HCl	0.12	0.13	0.14
L-蘇胺酸	0.05	0.04	0.05
營養組成			
ME, kcal/kg	2950	3050	3150
蛋白%	23.50	20.08	18.83
Ca	1.00	1.00	1.00
可用之P	0.45	0.45	0.45
Lys	1.36	1.14	1.06
Met	0.63	0.53	0.50
M+C	0.99	0.85	0.80
Thr	0.92	0.78	0.74
Trp	0.27	0.22	0.20
Arg	1.59	1.33	1.23
Ile	0.97	0.81	0.75
Leu	1.93	1.70	1.61
Val	1.08	0.92	0.86

表6.2.具有和不具有基於地衣芽孢桿菌之飼料添加劑或抗生素生長促進劑之飲食補充的動物在第0天至42天之間的性能表現。

	1 – 21 d		1 – 42 d	
治療	BW, g	FCR, g/g	BW, g	FCR, g/g
1. 對照飲食	880.7	1.43	2757.4	1.76
2. BMD	899.0	1.42	2781.6	1.74
3. DSM 32314	905.2	1.42	2824.2	1.74
差值	24.5	-0.01	66.8	-0.02
相對%	2.8	-0.70	2.4	-1.14

BW，在指定期間內之平均雞體重；FCR，在指定期間內之飼料對增重所計算出之飼料轉化率；對照飼料，在基礎飲食中不含任何添加劑； BMD，在基礎飲食中添加雙水楊酸伸甲基桿菌肽的治療飲食；DSM 32314，在基礎飲食中添加菌株DSM 32314的治療飲食；差值，當將DSM

32314組與對照飲食組相比較時所觀察到之數值差異；相對%，以從對照飲食組開始之變化百分比表示之DSM 32314組與對照飲食組之間的差異。

[0106] 來自此肉仔雞之數據表明與對照飲食組相比較，二種產品，BMD和DSM 32314可增進體重。然而，與對照飲食組相比較，該經預發佈產品D組治療之組別在第21和42天具有最高平均重量，分別增加24.5克和66.8克。同樣地，BMD和DSM 32314二個治療組在D21和D42FCR均降低。此研究表明在這些條件下，與對照飲食組相比較，DSM 32314能改善肉雞之FCR且至少與強效抗生素生長促進劑BMD同樣有效，甚至能達成取得所有組之最高平均體重。

參考文獻：

M'Sadeqa, S., Wua S., Swicka. R.A. and M. Chocta (2015). Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. Animal Nutrition. 1:1-11.

實施例7：對於不同致病菌株之孔擴散拮抗作用試驗

[0107] 以3種不同病原體盲腸腸球菌DSM 20683、雞鏈球菌DSM 15349和豬鏈球菌 ATCC 43765進行孔擴散拮抗作用試驗。

[0108] 已知盲腸腸球菌會導致肉雞跛行、關節炎和骨髓炎，這些通常係由關節及/或骨組織發炎引起。其他盲腸腸球菌可引起心包炎[Kense et al. 2011]。DSM 20683係從雞盲腸分離出。

[0109] 雞鏈球菌可在家禽中造成敗血症。肉眼病變包括脾腫大、肝腫大、腎腫大和充血。亦在肝臟和脾臟中觀察到與瓣膜性心內膜炎相關之多個區域壞死及/或梗死[Collins et al. 2002]。

[0110] 豬鏈球菌為豬之重要病原體且為仔豬斷奶後引起敗血症、腦膜炎和許多其他感染的最重要細菌性死亡原因之一[Goyette-Desjardins et al. 2014]。ATCC 43765屬於血清學組：R；血清型2且係從豬分離出。

[0111] 將芽孢桿菌菌株在37℃和200rpm下，在100mL搖動燒瓶中之10mL TSBYE(30g/l TSB + 6g/l酵母萃取物)或LB-Kelly (LB-培養基，補充有DSMZ培養基1032之微量元素溶液)中生長16小時。將該致病菌株在合適之條件下以液體培養物形式生長至在595nm之光密度至少為1，然後以無菌刮刀將100µl塗佈在瓊脂盤之表面上。雞鏈球菌係使用BHI瓊脂盤，盲腸腸球菌和豬鏈球菌係使用TSBYE瓊脂盤。在乾燥的盤內切出三個直徑為9 mm的孔。使用第1個孔作為不需培養之未經接種的培養基對照組，在第2個孔中接種100µL之非抑制性芽孢桿菌菌株(蠟狀芽孢桿菌toyoi變種，NCIMB 40112)，在第3個孔中接種100µL之枯草芽孢桿菌 DSM 32315或DSM 17299培養物。在37℃，合適之條件下培育24小時後，測量從切割孔之邊緣開始到透明區之邊界以測定透明區域之mm，每一株落測量二次(水平，垂直)，然後將其平均。結果可在表7.1中找到。

表7.1：比較地衣芽孢桿菌 DSM 32314和枯草芽孢桿菌 DSM 17299在孔擴散拮抗分析中對致病菌株的抑制能力，數值以 mm病原體清除區域表示。

病原體 → 益生菌↓	盲腸腸球菌 DSM 20683	雞鏈球菌 DSM 15349	豬鏈球菌 ATCC 43765
DSM 32314	5.7	16.1	18.0
DSM 17299	0.0	0.0	5.5

數據顯示，DSM 32314能非常有效地抑制盲腸腸球菌、雞鏈球菌和豬鏈球菌，尤其是與DSM 17299相較之下。

參考文獻：

MJ Kense, WJM Landman (2011). Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. Avian Pathology Vol. 40 , Iss. 6.

MD Collins, RA Hutson, E Falsen, E Ingana, M Bisgaard (2002). Streptococcus gallinaceus sp. nov., from chickens. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1161–1164.

G Goyette-Desjardins, J-P Auger, J Xu, M Segura, M Gottschalk (2014). Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerg Microbes Infect. 3(6):e45.

【生物材料寄存】

國內寄存資訊

1.食品工業發展研究所 2017/08/04 ; BCRC 910791

國外寄存資訊

1.德國 ; DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH (DSMZ) ; 2016/05/12 ; DSM 32314

【序列表】

<110> 贏創德固賽有限責任公司(Evonik Degussa GmbH)

<120> 具有益生菌活性之地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株

<140> TW 106117960
<141> 2017-05-31
<150> EP 16172151.9
<151> 2016-05-31
<150> EP 16196015.8
<151> 2016-10-27

<160> 5

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1
<211> 1538
<212> DNA
<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 1
agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60

ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtya gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa 120

cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat gcttgattga 180

accgcatggt tcaattataa aaggtggctt ttagctacca cttacagatg gacccgcggc 240

gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga 300

gggtgatcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag 360

ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggttt 420

tcggatcgta aaactctgtt gttagggaag aacaagtacc gttcgaatag ggcggtacct 480

tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta 540

ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggt ttcttaagtc 600

tgatgtgaaa gcccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggga acttgagtgc 660

agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac 720

cagtggcgaa ggcgactctc tggtctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc 780

gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg 840

gtttccgccc tttagtgctg cagcaaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggtcg 900

caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta 960

attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata 1020

gggcttcccc ttcgggggca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt 1080

gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccccttga tcttagttgc cagcattcag 1140

ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat 1200

catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tgggcagaac aaagggcagc 1260

gaagccgcga ggctaagcca atcccacaaa tctgttctca gttcggatcg cagtctgcaa 1320

ctcgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg 1380

ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg 1440

tgaggtaacc ttttggagcc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaagtcgta 1500

acaaggtagc cgtatcggaa ggtgcggctg gatcacct 1538

<210> 2
<211> 1197
<212> DNA
<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 2
gtgaagaata aatggctttc ttttttttca ggaaagatcc agcttgagat aacgggaaag 60
gggatcgagc gattattaaa tgaatgcacc aggcgcagca tcccgatgtt taatgttaag 120
aaaaagaaag acgctgtctt tctttatatt ccgctttctg atgtacatgc cttccggagg 180
gtcataaggg attttgactg caagtgccgc ttcgtcagac gaaaaggttt ccctttcctt 240
gtgcagaagt ctaaacggaa tagcggcttc actattggaa ttgctgcttt ttttatcatc 300
atgtttttat tgtccaacat gctctggaaa attgacataa caggagccaa tccggagaca 360
gaacatcaaa tcagacagca cttgaatcaa atcggcgtca aaaaagggcg ccttcagttt 420
acgatgctga ccccggaaaa aattcagcag gcgcttacaa agcgcgtcga aaacatcacc 480
tgggtgggca ttgaattaaa cggcacggcc cttcacatga aagtggttga aaaaaatgaa 540
cctgacaaag aaaaatatat tggtccgagg cacatcgtcg ccaaaaaagg ggcgaccatc 600
tcgaaaatgt tcgtggaaaa aggcgagccg ctcgtcaccg tgaatcagca cgttgaaaaa 660
gggcaaatgc ttgtttccgg actgatcggg agcgaagagg aaaagcaaaa agtcggagcc 720
aaagggaaaa tctacggtga aacctggtac aagtcaaagg taacggttcc tcttgagaca 780
tcatttgacg tttttacggg taaagtaagg acaagtcaca agctatcctt cggttctttt 840
tctgtgcctg tctggggctt ttcttttaaa aaagaagagt tctcgcgtcc gaagacagaa 900
accgaaaaac actcgctgca ttttatgaat tttacgcttc ctgtcgcgta tgaaaaggaa 960
catacgagag agagcgaaca aatcaaaagg gtgtactcga aaaaagaagc ggtccttgaa 1020
ggggtcgaaa tgggaaaaag agacatcagg aaaaaaatcg ggagcgacgg gaacattatt 1080
agtgaaaaag ttttgcacga aacgagtgag aatggtaaag ttaaattgat catcctttac 1140
caggttattg aagacattgt tcaaacaaca ccaattgttc aggagactaa agaatga 1197

<210> 3
<211> 1920
<212> DNA
<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 3
gtggcaatgg aacagcaaaa taattacgat gaaaatcaga tacaggttct agagggattg 60
gaagccgtgc ggaaaagacc cggaatgtac atcgggtcga caagcggcaa aggtctgcac 120
catttagtat gggaaattgt cgataacagc atcgatgaag cattggccgg ttactgcact 180
gaaatcaatg tcgaaattga aaaagacaac agcatcactg taaaagacaa cggacggggg 240
attccggtcg gtattcatga gaagatgggc cgtcccgctg tagaagtcat catgacagtc 300
ctgcacgccg gaggaaagtt tgacggaagc ggatataaag tttcaggcgg tttgcacggc 360
gtcggtgcat ctgttgttaa cgccctttca accgagctcg atgtaacggt ttacagagat 420
ggaaaagtcc attaccagga atttgaacgg ggcgttccga aagctgattt gaaagtcatc 480
ggagatacgg aagtgacggg aacgaccact cacttcaagc ctgatccgga aatattcacg 540
gaaacgacgg aatacgacta tgatacgctt gccactcgtg tccgggagct cgctttcttg 600
acaaaaggcg tcaaaatcac gattgaagac aagcgagaag gaaaagaacg caagaatgat 660
tactgctatg aaggcggtat taaaagctat gttgaacact tgaaccgttc acgggaagtg 720
gttcatgaag agccagtcta tattgaagga tccaaagacg gcattacggt cgaggtggct 780
cttcaataca acgacagtta taccagcaac atttattcgt ttgccaataa cattcatacg 840

tatgaaggcg gaacgcatga agccggcttt aagaccggtt tgacgagagt catcaatgat 900

tacgcgagaa ggaacggtgt cttcaaagaa agcgatccga acttaagcgg ggaagacgtc 960

cgtgaaggtt tgacagcgat catttcaatc aagcatccgg atcctcaatt tgaagggcag 1020

acgaaaacaa agcttggcaa ctcagaagcg cggacgataa cagatgcgct attttcagaa 1080

gcgctcgaaa agtttctgct tgaaaacccg gattcggcga aaaaaatcgt tgaaaaaggg 1140

gttatggccg ccagagcacg aatggctgca aagaaagcac gcgaactgac gcgcagaaaa 1200

agcgcccttg aagtgtcgaa tctgccgggg aaactggctg actgttcttc taaagacccg 1260

acgatttccg aactttacat cgttgagggt gactctgcgg gcggatcggc aaaacagggc 1320

cgcgatcgtc atttccaagc cattttgcct ttgagaggga aaatcttgaa cgtcgaaaaa 1380

gcacgcctgg acaaaatttt gtccaacaat gaggttcgtt ctatgatcac cgcgcttggc 1440

accgggatcg gggaagattt caatcttgaa aaagcccgct accacaaagt cgtgattatg 1500

acggatgccg acgtcgacgg tgcccacatc cgaacgttgc tgctgacctt tttctaccgc 1560

tacatgagac agatcatcga acaaggatat gtctacatcg ctcagccgcc gctttacaaa 1620

atacagcagg ggaaacgcgt tgagtatgcg tacaatgacc agcagctcga agaaattcta 1680

aaagagcttc cgcaaaatcc gaagccaggc ctgcagcgct ataaaggttt gggcgagatg 1740

aacgcgacac agctttggga aacgacgatg gaccctgaaa cgcggacatt gcttcaagta 1800

acgctcaaag atgcgatcga tgcggatgaa acctttgaaa tgctgatggg cgacaaggtt 1860

gagcctcgcc gcaactttat cgaagagaat gcccgatatg taaagaattt ggatatttaa 1920

<210> 4
<211> 3582
<212> DNA
<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 4
ttgacaggtc aactagttca gtatggacga caccgccagc gcagaagcta tgcacgcatt 60

agcgaagtgt tagaattacc aaatctcatt gaaattcaaa cctcttctta tcagtggttt 120

cttgatgagg gtcttagaga gatgtttcaa gacatatcgc caattgagga tttcactggt 180

aacctctctc tggaatttat cgactacagc ttgggcgagc ctaagtatcc ggtagaagaa 240

tcaaaagagc gcgacgtgac ctactcagct ccgctgcgtg ttaaagtccg cttaatcaac 300

aaagagaccg gtgaagtaaa ggatcaggat gtcttcatgg gtgatttccc tattatgaca 360

gacactggaa cctttattat caacggtgcg gaacgggtca ttgtatctca gctcgttcgt 420

tctccaagtg tatattttag tggtaaagta gacaaaaacg gtaagaaagg ttttaccgcg 480

actgtcattc caaaccgtgg cgcatggtta gaatacgaga ctgatgcgaa agatgttgtt 540

tatgtacgca tcgatcgcac acgtaagttg ccggttacgg ttcttttgcg tgctcttggc 600

ttcggatctg accaagagat cattgatctc atcggtgaaa acgagtattt gcgcaatacg 660

cttgataaag ataatacgga aaacaccgat aaagcgcttc ttgaaatcta cgagcgtctt 720

cgtccaggag agccgcctac agtagaaaac gcaaaaagcc tgcttgattc aaggttcttt 780

gatccgaaaa gatatgacct tgcaagtgta ggacgttata aaattaataa aaagcttcac 840

atcaaaaaca gactgtttaa tcagcggctt gctgaaacgc tgatcgatcc tgaaacaggc 900

gaaattcttg ccgaaaaagg cgcgatttta gacagaagaa cgcttgacaa agtcctgcct 960

taccttgaaa acggaatcgg ttttaaaaag ctgtatccga acggcggagt tgttgaagat 1020

gaagtgacgc ttcagtctat taaaatctat gccccgacag atcaagaagg ggagcagaca 1080
atcaatgtga ttggaaatgc ttatattgaa gaaggcgtta aaaatattac accttctgat 1140
attatctctt ccatcagcta tttctttaac ctgcttcacg gagtgggcga taccgacgat 1200
atcgaccatt taggaaaccg ccgtctccgt tcagtgggag agcttctgca aaaccaattc 1260
cgtatcggtt taagcagaat ggagcgtgtt gttcgtgaaa gaatgtctat tcaagataca 1320
aacacgatca cgccacagca gctgatcaat attcgccctg tcatcgcatc aatcaaagag 1380
tttttcggaa gctcgcagct ttctcagttt atggatcaga cgaatccgct tgctgagctg 1440
acgcataagc gccgtctgtc agcgctcgga ccgggcggtt tgacccgtga gcgcgccgga 1500
atggaagtcc gtgacgttca ctattcccac tacggccgga tgtgtccgat tgaaactcct 1560
gagggtccaa acatcggctt gatcaactcg ctttcttcat tcgcgaaagt gaaccgtttc 1620
ggcttcatcg aaacgccgta tcgccgcgtt gaccctgaga ctggaaaagt aacgccgaga 1680
atcgattact tgacagctga tgaagaagac aactatgtcg ttgcccaggc taacgcacgt 1740
ctgaatgatg acggatcttt tgtggatgac agcatcgtcg cccgtttcag aggggagaac 1800
accgttgttc cgaaagaccg cgtcgactat atggacgttt cgcctaaaca ggttgtctct 1860
gccgcgactg catgtattcc tttcttggaa aacgacgact caaaccgcgc cctaatggga 1920
gcgaacatgc aacggcaggc tgtacctctt atgcagcctg aatctccgat cgtcggaacc 1980
ggaatggagt atgtatctgc aaaagactcc ggtgccgctg ttatttgccg ccatcctgga 2040
atcgttgaac gggtggaagc gaaaaacatc tgggtgcgcc gctatgaaga agtcgacggc 2100
cagaaagtca aaggaaacct tgataaatac agcctgctga agtttgttcg ttccaaccag 2160
ggaacttgct acaaccagcg tccgatcgta agcgtcggtg atgaggttgt aaaaggtgaa 2220
attttagctg acggtccgtc tatggaaaaa ggtgagcttg cccttggacg caacgtcatg 2280
gtcggcttta tgacatggga tggctacaac tacgaggatg ccatcatcat gagcgaacgc 2340
cttgtaaaag acgacgtata cacgtctatt catattgagg aatacgaatc agaggcccgg 2400
gatacaaaac tcggacctga agaaattaca cgcgatattc caaacgtcgg tgaagacgct 2460
cttcgcaatc tcgatgaacg cggaattatc cgtgtcggtg ctgaagtaaa agacggagat 2520
cttcttgttg gtaaagtaac gcctaaaggt gttacagagc ttactgcaga agagcgcctg 2580
cttcacgcca tcttcggcga aaaagcgcgt gaagtccgcg atacgtcgct gcgtgtgccc 2640
cacggaggcg gcggtatcat ccttgatgta aaagtgttca accgcgaaga cggagacgaa 2700
ctgcctccgg gcgttaacca gctcgtccgc gtttacatcg ttcagaaacg taaaatttct 2760
gaaaggggaca aaatggccgg acgccacggg aacaaaggtg ttatttcgaa aatccttccg 2820
gaggaagata tgccgtatct gcctgacgga acaccgattg acatcatgtt aaacccgctg 2880
ggcgtaccat cgcgtatgaa catcgggcag gtgttggagc tgcaccttgg tatggctgca 2940
cgccgtctcg gtctgcatgt cgcgtcgccg gtatttgacg gtgcccgcga agaagatgtg 3000
tgggaaacgc ttgaagaagc cggcatgtca agggacgcaa agacagtcct ttacgacggc 3060
cgaactggag agccgtttga caaccgggtg tctgtcggca tcatgtacat gatcaaattg 3120
gctcacatgg ttgacgacaa attgcacgcg cgttctacag gtccttactc actcgttacc 3180
cagcagcctc ttggaggtaa agcgcagttc ggtggacagc gttttggaga gatggaagtt 3240
tgggcgcttg aagcttacgg cgcagcatat acacttcaag aaatcctgac tgttaaatcg 3300

gatgatgtcg taggccgtgt gaaaacatac gaagccatcg taaaaggcga caatgttcca 3360

gaacctggtg ttccggaatc gttcaaagta ttgatcaaag agcttcaaag cttaggtatg 3420

gacgtcaaaa tcctatcaag cgacgaagaa gaaatcgaaa tgagagactt ggaagacgac 3480

gaagacgcga aacaaaacga agggctttct ctgccgaatg atgaagagtc cgaagaattc 3540

gtttctgctg acgcagagcg cgatgtcgtc acaaaagaat aa 3582

<210> 5
<211> 1635
<212> DNA
<213> 地衣芽孢桿菌

<400> 5
atggcaaaag atattaagtt tagcgaagaa gcccgccgtt caatgctgcg cggtgtagat 60

gcattggcgg atgctgtaaa ggtaactttg ggacctaaag gacgcaacgt cgttcttgag 120

aaaaaattcg gttctccatt aatcacaaac gacggtgtta ccatcgcgaa agaaatcgaa 180

cttgaagacg cgttcgaaaa catgggcgca aagcttgttg ctgaagttgc gagcaaaaca 240

aacgatgttg ccggtgacgg tacaacaaca gcgacagttc tagctcaagc gatgattcgc 300

gaaggtctta aaaacgtaac tgccggcgct aaccctgtag gcgtgcgcaa aggtatcgag 360

caggctgtgg ctgtagcggt tgaaagcctg aaagaaatct ccaaaccaat cgaaggcaaa 420

gaatcaatcg cacaagttgc ttcaatctcc gctgctgacg aagaagtcgg aagcctgatc 480

gctgaagcga tggagcgcgt cggcaacgac ggtgtcatca cgatcgaaga atcaaaagga 540

ttcacaacag agcttgaagt ggttgaaggt atgcagttcg accgcggata tgcgtctcct 600

tacatggtga cagattccga taagatggaa gcggttcttg agaacccgta catcttagta 660

acagacaaaa aaatcacaaa cattcaagaa atcctgccgg tgcttgagca agttgttcag 720

caaggcaaac cgttgcttct gattgctgaa gacgttgaag gtgaggctct tgcaacattg 780

gttgtcaaca agcttcgcgg aacattcaac gcagtggctg ttaaagcgcc tggattcgga 840

gaccgccgca aagcgatgct cgaagacatc tcgatcctga caggtgccga agtgatcaca 900

gaagatttag gtcttgacct taaatcaact caaatcaacc aattgggacg cgcttctaaa 960

gttgttgtga caaaagaaaa cacaacaatc gttgaaggtg cgggagatac agagcaaatc 1020

gcggcacgcg tcaaccaaat ccgcgctcaa gttgaagaaa caacttctga gttcgataaa 1080

gaaaaattac aagagcgcct agctaagctt gcaggcggcg tagctgtcat caaagtcggc 1140

gctgcgactg aaacagaatt gaaagaacgc aagcttcgca tcgaagacgc cctgaactct 1200

actcgcgctg cggtagaaga aggaatcgta tcaggcggtg gtacagctct tgtcaatgtt 1260

tacaataaag tagctgccct tgaagctgaa ggcgacgaac tgactggtat caacatcgtt 1320

cttcgcgctc ttgaagaacc aatccgtcaa atcgcgcaca atgcgggtct tgaaggatct 1380

gtcatcgttg agcgcctgaa aggcgaagct attggtgtag gctacaacgc tgcaacaggc 1440

gaatgggtga acatgatcga caaaggtatc gttgacccta caaaagtaac acgctcagct 1500

ctgcaaaacg cagcatctgt agcggctatg ttcctgacaa ctgaagcagt tgttgccgac 1560

aagcctgaag aaaacaaagg cggcgcagga atgcctgaca tgggcggcat gggtggtatg 1620

ggcggcatga tgtaa 1635

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種選自下列群組之地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)菌株或其製劑：

a) 寄存在DSMZ且編號為DSM 32314之地衣芽孢桿菌菌株；

b) 寄存編號DSM 32314之該地衣芽孢桿菌菌株之突變株，該突變株具有該菌株DSM 32314之所有識別特徵；

c) (a)或(b)之製劑；

d) 含有如(a)、(b)或(c)所含有之化合物的有效混合物之製劑。

【第2項】

如申請專利範圍第1項之地衣芽孢桿菌菌株或製劑，其中該(b) DSM 32314之突變株與該菌株DSM 32314具有至少95% DNA序列同一性。

【第3項】

一種地衣芽孢桿菌菌株或其製劑，其中該地衣芽孢桿菌菌株顯示下列特徵：

a) 16S rDNA序列，其與SEQ ID NO：1之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，尤其100%序列同一性；及/或

b) yqfD序列，其與SEQ ID NO：2之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，尤其100%序列

同一性；及/或

c) gyrB序列，其與SEQ ID NO：3之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，尤其100%序列同一性。

【第4項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或製劑，其中該地衣芽孢桿菌菌株顯示下列進一步特徵：

d) rpoB 序列，其與SEQ ID NO：4之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，尤其100%序列同一性；及/或

e) groEL 序列，其與SEQ ID NO：5之多核苷酸序列具有至少99%，較佳至少99.5%，尤其100%序列同一性。

【第5項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株，其特徵在於能厭氧生長，尤其是能在厭氧條件下降解不溶於水之纖維素。

【第6項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株，其特徵在於能抑制產氣莢膜梭菌(C. perfringens)，尤其是在於在孔擴散拮抗分析中，在LBKelly瓊脂盤上對於產氣莢膜梭菌菌株ATCC 13124可清除至少10 mm，更佳至少13 mm之病原體。

【第7項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株，其特徵在於能在0.05重量%醋酸、0.05重量%丙酸及/或0.2重量%乳酸之存在下生長。

【第8項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株，其特徵在於具有至少200 mU/mL，較佳至少230 mU/mL，尤其至少250 mU/mL之纖維素酶活性，及/或至少10 mU/mL，較佳至少15 mU/mL之木聚醣酶活性，及/或至少6 mU/mL，較佳至少8 mU/mL之蛋白酶活性。

【第9項】

如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株，其特徵在於能在2 mM膽汁，較佳4 mM膽汁之存在下生長，尤其在於在2 mM膽汁之存在下，AUC5性能值(performance value)為至少0.3，較佳至少0.4，尤其至少0.5且AUC10性能值為至少1.5，較佳至少1.75，尤其至少2.0。

【第10項】

一種如前述申請專利範圍中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或其製劑於作為飼料或食品之益生菌成分(DFM)的用途。

【第11項】

一種飼料或食品組成物，其含有如申請專利範圍第1至9項中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或其製劑及至少一種其他飼料或食物成分，該其他飼料或食物成分較佳選自：

蛋白質、碳水化合物、脂肪、其他益生菌、益生元、酶、維生素、免疫調節劑、乳汁替代物、礦物質、胺基酸、抗球蟲藥(coccidiostat)、以酸為底質之產品、藥品及彼等之組合。

【第12項】

一種醫藥組成物，其含有如申請專利範圍第1至9項中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或其製劑及醫藥上可接受之載體。

【第13項】

如申請專利範圍第11或12項之組成物，其係用於改善動物或人類之健康狀態，尤其是腸道健康狀態。

【第14項】

一種餵食動物之方法，該動物尤其是禽類，更佳為雞，該方法之特徵在於對該動物施用如申請專利範圍第1至9項中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或其製劑及/或如申請專利範圍第11項之食品組成物及/或如申請專利範圍第12項之醫藥組成物。

【第15項】

一種改善動物或人類之健康狀態之方法，該健康狀態尤其是腸道健康狀態，該方法包含對該動物或人類投予如申請專利範圍第1至9項中任一項之地衣芽孢桿菌菌株或其製劑或如申請專利範圍第11至13項中任一項之組成物。

【第16項】

一種增進動物之健康及/或改善動物之一般身體狀況

及/或改善動物之飼料轉化率及/或降低動物之死亡率及/或增加動物之存活率及/或改善動物之增重及/或增加動物之疾病抵抗力及/或增強動物之免疫反應及/或建立或維持動物之健康腸道微生物叢及/或減少通過動物糞便泄出病原體的方法，其中投予動物至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之菌株及/或至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之製劑或至少一種如申請專利範圍第11至13項中任一項之組成物。

【第17項】

一種控制及/或避免糞肥或受污染之液體危害環境效果的方法，該方法包含對糞肥、受污染之液體、垃圾、窪坑或糞肥池投予至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之菌株及/或至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之製劑及/或至少一種如申請專利範圍第11至13項中任一項之組成物的步驟。

【第18項】

一種控制及/或改善水或水溶液之品質的方法，該水或水溶液尤其是飲用水或飼養用水，該方法包含對水或水溶液施用至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之菌株及/或至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之製劑及/或至少一種如申請專利範圍第11至13項中任一項之組成物的步驟。

【第19項】

一種治療及/或預防栽培植物之微生物疾病的方法，

其包含對栽培植物投予至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之菌株及/或至少一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之製劑及/或至少一種如申請專利範圍第11至13項中任一項之組成物的步驟。