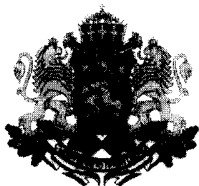


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 97909A

(51) C12N 1/00

C12N 11/02

C12N 1/20

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 97909

(22) Заявено на 28.06.1993

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 635973 (32) 31.12.1990 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 6 | 30.06.1994

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL,
INC. , , 50131 JOHNSTON , DARWIN
BUILDING, 7100 N.W. 62ND AVENUE,
P.O.BOX 1000 IOWA (US) ;

(72) Изобретател(и):

RUTHERFORD , WILLIAM M . , DES
MOINES,IA (US) ; ALLEN , JACK E . ,
GRIMES,IA (US) ; SCHLAMEUS , HERMAN
W . , SAN ANTONIO,TX (US) ; MANGOLD ,
DONALD J . , SAN ANTONIO,TX (US) ;
HARLOWE JUN. , WILLIAM W . , SAN
ANTONIO,TX (US) ;

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова , 1124 София ,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № на PCT заявка:

PCT/ US91/0 / 2118 , 29.03.1991

(87) № и дата на PCT публикация:

92/122 / 34 , 23.07.1992

(54) МИКРОКАПСУЛИРАНИ БАКТЕРИИ

(57) 1. Бактериален продукт за хранителни цели, характеризиращ се с това, че се състои от сушени, микрокапсулирани на ротационен диск капсули от бактерии *Enterococcus faecium*, които са микрокапсулирани с м астна киселина и имат стабилност от три до шест месеца.

13 претенции , 0

BG 97909A

МИКРОКАПСУЛИРАНИ БАКТЕРИИ

Изобретението се отнася до микрокапсулирани бактерии, намиращи приложение като хранителни добавки.

Известно е, че някои бактерии проявяват мощен ползотворен ефект когато се прибавят към храната на животните. Ползотворният ефект на тези бактерии се проявява в това, че те осигуряват една естествена микрофлора в храносмилателния път. Някои производители предлагат в продажба пробиотици, които съдържат живите бактерии. При тези пробиотици обаче има затруднения при поддържането на стабилността на продукта. Характерно е, че пробиотичите се използват в твърде малки количества като се прибавя към храната на животните приблизително от 1 %. При това, често неизползвана съдържаща пробиотична храна или самата добавка за храна се съхранява от производителите за пределимитен период от време. Често съхраняването се извършва при условия съдържащи известна влага. В много от случаите влагата точно стига за активирането на бактериите и те започват да растат, но все пак влагата не е в достатъчно количество за да поддържа развитието им. В резултат на това те умират. С това се задушава активността на пробиотика.

В други случай, прибавянето на антибиотици към съдържащата пробиотици храна или добавка за храна повлиява неблагоприятно на бактериите, особено ако са на лице малки количества влага, и така бактериите отново биват унищожени. Поради това, значителен проблем представлява дългосрочното съхраняване стабилността на пробиотиците.

При други случай, когато пробиотика се прибавя към храната на пилетата, то пелетизирането на продукта се извършва обикновено след като пробиотика е прибавен към храната. При тези случай влагата от парата, използвана при пелетизацията, частично активира бактериите, но може поради недостатъчна влага да не поддържа тяхното развитие и в резултат на това да ги убие. Температурата при пелетизацията може също така да ги унищожи. Съществува също така проблема с киселинността на стомашната среда която значително дезактивира бактериите преди те да достигнат в тънките черва.

Поради това, продължава да съществува необходимостта от пробиотици, които да освобождават микроорганизмите само в подходящия момент в тънките черва, без това да става предварително поради наличието на влажни условия или неблагоприятно рН, каквито има в храносмилателния път предшестваш тънките черва.

Задача на настоящето изобретение е да осигури пробиотици подходящи като добавка към храната на животните, които съдържат бактерии микрокапсулирани в специална ротационна капсулираща техника, при използване на мастни киселини като капсулиращо вещество.

Друга задача на настоящето изобретение е да осигури пробиотик който остава стабилен в продължение на 3 месеца до шест месеца без при това да се намалят съдържащите се в него микроорганизми.

Друг предмет на настоящето изобретение е да разработи метод за ротационно микрокапсулиране на сушени бактерии при който се получават отделни сфери от покрити бактерии, без при това да се получават конгломерати и бучки от сферите на покритите бактерии.

Друг предмет на настоящето изобретение е да се получат микрокапсулирани на ротационен диск изсушени бактерии, които са свободно течливи и с които лесно се работи при смесването им в определени съотношения с храната на животните.

Друг предмет на настоящето изобретение е също така да се получат микрокапсулирани *Enterococcus faecium*.

На фигури 1, 2 и 3 графично е показана стабилността на капсулирани щамове при изпозване на стеаринова киселина като капсулиращо вещество.

Получени са отделни частички от капсулирани с мастна киселина бактерии, за предпочитане стеаринова киселина, като бактериите са *Enterococcus faecium*. Изсушена чрез замразяване бактериална култура се смесва в съотношение от 50 % до 90 % тегловно със стопилка от стеаринова киселина и след това се капсулира чрез ротационен диск.

Изобретението се отнася до изсушени чрез замразяване бактерии микрокапсулирани чрез ротационен диск. Предпочита се капсулите да са микрокапсулирани със свободна мастна киселина. Има два важни и от съществено значение аспекти на настоящето изобретение, които го отличават от предишните капсулирани бактерии. Първо, това е природата на капсулиращото средство, а именно мастната киселина. Второ, това е самия капсулиращ процес при който не се използва обичайната техника за изсушаване чрез разпръскване, а се прилага метод на ротационно дисково микрокапсулиране. Само съвместното действие на тези два елемента осигуряват много стабилен пробиотик от настоящето изобретение. Ако се прилага всеки един от тези елемента самостоятелно, то не се постига стабилност.

Предпочитано капсулиращо средство е C_{12} до C_{24} свободна мастна киселина. Могат да се прилагат и смеси от мастни киселини, но се предпочита използването на чиста свободна мастна киселина. Предпочита се също така свободната мастна киселина да бъде ненаситена мастна кисе-

28.08.93

лина, като най-предпочитана е стеариновата киселина.

Най-общо, важно е масната киселина да има температура на топене по-ниска от 75°C , за предпочитане от порядъка на 40° до 75°C . Естествено, тя трябва да е твърда при стайна температура с оглед да бъде ефективна като капсулиращо средство. Всички свободни мастни киселини, които отговарят на току-що дадената химическа характеристика, могат да се използват за тази цел.

Бактериите, които ще се капсулират, не са от определящо значение. Какви бактерии по-точно ще се подберат зависи от прабиотика който се цели да се получи. Най-общо, за целите на настоящето изобретение, *Enterococcus faecium* е предпочитаната бактерия. Трябва да се подразбира, че други бактерии като *Lactobacillus*, *Bacillus* и т.н. могат също така да се използват. Могат да се използват както отделни щамове, така и смеси от тях. За да се подобри стабилността на продукта, в него се влагат типично изсушени чрез замразяване бактерии. Така при прибавяне на влага, те могат да се съживят.

В микрокапсулите съгласно изобретението, в съответствие с метода описан по-долу, микрокапсулираните частички съдържат около 50 % до 90 % тегловно мастно-киселинен компонент и останалото до 100 % бактериална култура. Предпочитаното съотношение е от около 60 % до около 75 % мастна киселина. Ако се използва много малко мастна киселина, то покритието няма да може да осигури ефективна защита. От друга страна, ако се използва много повече от киселината, то покритието ще е много дебело и няма да освобождава равномерно бактерии в червата.

Методът, използван в настоящето изобретение е микрокапсулиране чрез ротационен диск. Най-общо, при технологията с ротационен диск, суспензия от бактериите и масната киселина се смесват добре и получената смес се прибавя при равномерна скорост в центъра на ротиращ диск от неръждаема стомана. В резултата на центробежни сили, масата се разпръсква навън. След това тя се събира в охладителна камера в

28.08.93

която се поддържа температура на околната среда или малко по-ниска. След това продукта се конфекционира и се подготвя за опаковане.

Докато ротационното дисково капсулиране е известно, не е известно използването му при бактерии за микрокапсулиране на изсушени чрез замразяване бактерии. Най-общо, описание на капсулиране чрез ротационен диск е дадено в публикацията на Джонсън и съавтори от Югозападния Изследователски Институт в Сан Антонио в *Journal of Gas Chromatography*, октомври, 1965, стр. 345 - 347. В допълнение, ротационен дисков капсулатор, който може да се използва съгласно метода на настоящето изобретение, е описан в *United States Letters Patent, Sparks, 4 675 140*, издаден 23 юни 1987 г. със заглавие "Метод за покриване на частички от течни капчици".

Важно е да се подчертае, че ротационното микрокапсулиране осигурява рязко отличаващ се продукт в сравнение с този получен от конвенционалната ^{вертикална} разпръсквателна сушилка. В обичайната вертикална разпръсквателна сушилка се получава продукт, чиито частички проявяват тенденция на сбиване, обвивката на частичките не е равномерна поради което и стабилността на продукта може значително да се намали, дори в разстояние на дни и седмици. Когато се използва ротационен микрокапсулатор, особено с капсулиращи средства прилагани съгласно настоящето изобретение, стабилността на получаващите се бактерии, дори подложени на известна влажност и антибиотици, ще бъде много по-продължителна от три до шест месеца.

Когато като микрокапсулиращо средство се използва свободна мастна киселина съгласно настоящето изобретение, в по-горе описаните съотношения, то като капсулатор обикновено се използва 4 инчов ротиращ диск, въртящ се със скорост от 2000 оборота в минута до 4000 оборота в минута, за предпочитане около 2500 оборота в минута до 3200 об/мин със скорост на захранване от 50 г до 200 г в минута. За сега известните предпочитани условия при използването на стеаринова киселина и

Enterococcus faecium, са четири инчов ротиращ диск при 3000 об/мин и скорост на захранване 100 г в минута със суспензията от бактерии/стеаринова киселина при съотношение 35 % бактерии и 65 % стеаринова киселина. При спазване на тези условия, се получава продукт с размер на частичките от 75 до 300 микрона, като предпочитания размер е по-малък от 250 микрона.

Следващите примери са дадени за да илюстрират по-пълно, а не да ограничат, метода на настоящето изобретение. Примерите са описани във връзка с Фигури 1, 2 и 3.

ПРИМЕР 1

Пример 1 се отнася до Фигура 1. Той показва стабилността на продукта при два различни щам на *Enterococcus faecium* при температури 4° С и 27° С. Както е показано на Фигура 1, проследена е стабилността на капсулиран щам *Enterococcus faecium*, при който капсулирането е извършено чрез ротационен диск, а за капсулирането се използва стеаринова киселина като количеството на бактериалната култура е 35 % тегловно. Условията при капсулирането са същите, каквито бяха описани по-горе, а именно 35/65 бактерии към стеаринова киселина в суспензия и при температура 60° С, използва се четири инчов въртящ се диск, който работи при 3000 оборота в минута, а захранването се извършва с 100 г в минута. Бактериалната култура се капсулира, поставя се в непропускливи торбички които се запояват чрез топлина и ежеседмично се проверяват за СГУ. Може да се види, че продуктът съгласно изобретението отлично запазва способността си микроорганизмите да образуват колонии (СГУ), дори при съхранение в продължение на 70 дни.

ПРИМЕР 2

Пример 2 трябва да се разглежда във връзка с Фигура 2. Фигура 2 показва стабилността на индивидуално капсулиран щам когато се смеси в определено съотношение към храната на птици в която има три птичи антибиотика. Храната се състои от следните компоненти:

- 54 % едросмляни царевични зърна
- 26 % соево брашно
- 2 % рибно брашно със съдържание на влага 12 %
- 1.5 % двукалциев фосфат
- 1 % варовик
- 5.5 % соево масло

Три антибиотика се прибавят в следните тегловни количества: Декокс 6 % (454 ppm), Салиномицин (50 ppm) и натриев момензин (120 ppm). Бактериалната култура се прибавя към сместа така че да отдава приблизително 1×10^6 CFU /г храна (100 - 150 г/тон). Храната се опакова в топлинно затворени торби и се съхранява при стайна температура. Всяка седмица се взима проба за определяне на CFU. Графиката на фигура 2 илюстрира отличната стабилност на продукта.

ПРИМЕР 3

Пример 3 трябва да се интерпретира във връзка с фигура 3. Показана е стабилността на капсулиран *Enterococcus faecium* -на смес с храна в присъствието на различни антибиотици. Храната се състои от 60 % фино натрошена царевица, 38 % соево брашно и 2 % варовик със съдържание на влага около 14 %. Бактериалната култура се прибавя в количество приблизително 10^6 CFU /г храна и се смесва добре. Количества от по десет паунда се съхраняват в запоени торбички при 20° C и всяка седмица в продължение на 16 недели се взимат проби от тях за анализ. Антибиотиците се включват в храната в следните количества:

Бацитрацин метилен дисалицилат	50 г/тон
Карбадокс	50 г/тон
Хлортетрациклин	200 г/тон
Лазалоцид	30 г/тон
Линкомицин	100 г/тон
Неомицин	140 г/тон
Окситетрациклин	150 г/тон

20.08.93

Сулфаметацин	100 г/тон
Тилозин	100 г/тон
Вирджиниамицин	20 г/тон
ASP 250	100 г/тон

На таблица 1 са дадени минималните времена за което се получава 1 log загуба в образуващи колонии единици (СГЧ).

Таблица 1

Време в дни за което се загубва 1 log СГЧ при 20° С и съдържание на 14 % влага в храната

Антибиотик	Време на съхранение (дни)
Контрола	103
Бацитрацин	88
Карбадокс	54
Хлортетрациклин	60
Лазалоцид	57
Линокомицин	75
Неомицин	53
Окситетрациклин	59
Сулфаметацин	62
Тилозин	52
Вирджиниамицин	112
ASP 250	67
Фурадокс	53

ПРИМЕР 4

В пример 4 се определя стабилността на продукта след пелетизиране не за да се използва като храна за пилета. Условията на капсулиране описаните по-рано. Условията за изследване са както следна:

суров протеин, не по-малко от	18.0 %
сурови мазнини, не по-малко от	5.0 %

28.08.93

сурови влакна, не повече от 6.0 %

Пелетите с и без антибиотик (СТС 50 г/тон) се правят със следните съставки и при следните условия:

царевица, **SEM**, суроватка, соево масло, дикалциев дифосфат, варовик, следи от минерални примеси, витаминни добавки, селен, меден сулфат. Бактериалната култура се прибавя приблизително в количество 5×10^5 CFU/г храна (100 - 150 г/тон).

Температурата на кондициониране е 70°C и пелетите на изхода след оцветяването имат 78°C .

Пелетите се съхраняват в незатворени торбички и всяка седмица се взима проба за изследване на CFU.

При всяки от случаите, пелетизираният продукт не се повлиява неблагоприятно по отношение на стабилността му при условията на пелетизиране. По-специално, пелетизираният продукт показва стабилност равна на тази на непелетизирания продукт.

От тук се вижда, че изобретението отговаря на всички поставени задачи.

Патентни претенции

1. Изсушени, чрез ротационен диск микрокапсулирани капсули от бактерии, като капсулиращото вещество е мастна киселина.
2. Микрокапсулирани бактерии съгласно претенция 1, при които мастната киселина представлява C_{12} до C_{24} мастна киселина.
3. Микрокапсулирани бактерии съгласно претенция 2, при които мастната киселина е стеаринова киселина.
4. Микрокапсулирани бактерии съгласно претенция 1, при които капсулите съдържат от около 50 % до около 90 % мастна киселина и до 100 % бактериална култура.
5. Микрокапсулирани бактерии съгласно претенция 1, при които размерите на капсулите са от 75 до 300 микрона.
6. Микрокапсулирани бактерии съгласно претенция 1, при които бактериите са *Enterococcus faecium*.

28.06.93

7. Метод за получаване на отделни капсули от капсулиране в мастна киселина бактерии, който се състои в следното: получаване на бактериална култура от изсушени чрез замразяване бактерии, смесване на тези бактерии със стопилка от мастна киселина в количество от 50 % до около 90 % по тегло и капсулиране на тази смес от мастна киселина и изсушена чрез замразяване бактериална култура на ротационен дисков капсулатор при което се получават отделни покрити свободно течливи капсули от бактерии.

8. Метод съгласно претенция 7 при който ротационният диск работи при обороти от порядъка на 2000 до 4000 об/мин.

9. Метод съгласно претенция 7, при който ротационният диск работи при обороти в порядъка на 2500 до 3200 оборота в минута.

10. Метод съгласно претенция 7, при който скоростта на захранване на ротиращия диск с материал е от 50 грама на минута до 200 г/мин.

11. Метод съгласно претенция 7 при който свободната мастна киселина е C_{12} до C_{24} мастна киселина.

12. Метод съгласно претенция 11 при който свободната мастна киселина е стеаринова киселина.

13. Метод съгласно претенция 7, при който бактериите са *Enterococcus faecium*.