



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109477064 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780033991.5

(22)申请日 2017.05.24

(30)优先权数据

16172151.9 2016.05.31 EP

16196015.8 2016.10.27 EP

(66)本国优先权数据

201610564646.1 2016.06.03 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/062495 2017.05.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/207371 EN 2017.12.07

(83)生物保藏信息

DSM 32314 2016.05.12

DSM 32315 2016.05.12

(71)申请人 赢创德固赛有限公司

地址 德国埃森

(72)发明人 D·彼得里 S·佩尔策

J·克莱因伯尔廷 S·莫尔克

M·基普克 C·博格迈尔

S·赫博尔德 G·莫伊雷尔

R·惠兰 K·多拉纳利

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 于辉

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/10(2006.01)

A01N 63/02(2006.01)

A23K 10/18(2006.01)

A61K 35/742(2006.01)

权利要求书2页 说明书22页

序列表6页

(54)发明名称

具有益生菌活性的地衣芽胞杆菌菌株

(57)摘要

本发明涉及一种具有强产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)抑制作用的新型地衣芽胞杆菌菌株及其作为益生菌的用途。

1. 一种地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 菌株或其制剂, 其选自以下:
 - a) 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 编号为 DSM 32314 的地衣芽孢杆菌菌株;
 - b) 以编号 DSM 32314 保藏的所述地衣芽孢杆菌菌株的突变株, 所述突变株具有所述菌株 DSM 32314 的所有识别特征;
 - c) (a) 或 (b) 的制剂;
 - d) 含有如 (a)、(b) 或 (c) 所含有的化合物的有效混合物的制剂。
2. 根据权利要求 1 中的 (b) 所述的编号 DSM 32314 的地衣芽孢杆菌的突变株, 其中所述突变株与所述菌株 DSM 32314 具有至少 95% 的 DNA 序列相同性。
3. 一种地衣芽孢杆菌菌株或其制剂, 其中所述地衣芽孢杆菌菌株表现出以下特征:
 - a) 16S rDNA 序列, 其与 SEQ ID NO:1 的多核苷酸序列具有至少 99%、优选至少 99.5%、最优选 100% 的序列相同性; 和/或
 - b) yqfD 序列, 其与 SEQ ID NO:2 的多核苷酸序列具有至少 99%、优选至少 99.5%、最优选 100% 的序列相同性; 和/或
 - c) gyrB 序列, 其与 SEQ ID NO:3 的多核苷酸序列具有至少 99%、优选至少 99.5%、最优选 100% 的序列相同性。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或制剂, 其中所述地衣芽孢杆菌菌株表现出以下特征:
 - d) rpoB 序列, 其与 SEQ ID NO:4 的多核苷酸序列具有至少 99%、优选至少 99.5%、最优选 100% 的序列相同性; 和/或
 - e) groEL 序列, 其与 SEQ ID NO:5 的多核苷酸序列具有至少 99%、优选至少 99.5%、最优选 100% 的序列相同性。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株, 其特征在于其能厌氧生长, 尤其是能在厌氧条件下降解不溶于水的纤维素。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株, 其特征在于其能抑制产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*), 特别是在于在孔扩散拮抗测定中, 在 LB Kelly 琼脂板上相对于产气荚膜梭菌模式菌株 ATCC 13124 其病原体清除至少为 10mm, 更优选至少为 13mm。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株, 其特征在于其能在 0.05 重量% 醋酸、0.05 重量% 丙酸和/或 0.2 重量% 乳酸的存在下生长。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株, 其特征在于其具有至少 200mU/mL、优选至少 230mU/mL、特别是至少 250mU/mL 的纤维素酶活性, 和/或至少 10mU/mL、优选至少 15mU/mL 的木聚糖酶活性, 和/或至少 6mU/mL、优选至少 8mU/mL 的蛋白酶活性。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株, 其特征在于其能在 2mM 胆汁、优选 4mM 胆汁的存在下生长, 特别在于在 2mM 胆汁的存在下, AUC₅ 性能值为至少 0.3、优选至少 0.4、最优选至少 0.5 且 AUC₁₀ 性能值为至少 1.5、优选至少 1.75、最优选至少 2.0。
10. 一种根据前述权利要求中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或其制剂用作饲料或食物产品的益生菌成分 (DFM) 的用途。
11. 一种饲料组合物或食物组合物, 其含有如权利要求 1 至 9 中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或其制剂及至少一种其他饲料或食物成分, 所述其他饲料或食物成分优选选自: 蛋白质、碳水化合物、脂肪、其他益生菌、益生元、酶、维生素、免疫调节剂、乳汁替代物、矿物

质、氨基酸、抗球虫药、基于酸的产品、药物及其组合。

12. 一种药物组合物,其含有如权利要求1至9中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或其制剂,以及药学上可接受的载体。

13. 根据权利要求11或12所述的组合物,用于改善动物或人类的健康状态、特别是肠道健康状态。

14. 一种饲养动物、特别是禽类、更优选为鸡的方法,其特征在于向所述动物施用如权利要求1至9中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或其制剂,和/或施用根据权利要求11所述的饲料组合物和/或根据权利要求12所述的药物组合物。

15. 一种改善动物或人类的健康状态、特别是肠道健康状态的方法,其包含向所述动物或人类施用如权利要求1至9中任一项所述的地衣芽孢杆菌菌株或其制剂,或如权利要求11至13中任一项所述的组合物。

16. 一种增进动物的健康和/或改善动物的一般身体状况和/或改善动物的饲料转化率和/或降低动物的死亡率和/或增加动物的存活率和/或改善动物的增重和/或增加动物的疾病抵抗力和/或增强动物的免疫反应和/或建立或维持动物的健康肠道微生物群落和/或减少通过动物粪便脱落病原体的方法,其中向所述动物施用至少一种如权利要求1至9中任一项所述的菌株和/或制剂,或至少一种如权利要求11至13中任一项所述的组合物。

17. 一种控制和/或避免粪肥或被污染的液体的有害环境影响的方法,所述方法包含向粪肥、被污染的液体、褥草、陷坑、或粪池中施用至少一种如权利要求1至9中任一项所述的菌株和/或制剂,和/或至少一种如权利要求11至13中任一项所述的组合物的步骤。

18. 一种控制和/或改善水或水溶液、特别是饮用水或饲养用水的质量的方法,所述方法包括向水或水溶液施用至少一种如权利要求1至9中任一项所述的菌株和/或制剂,和/或至少一种如权利要求11至13中任一项所述的组合物的步骤。

19. 一种治疗和/或预防栽培植物的微生物疾病的方法,其包含向栽培植物施用至少一种如权利要求1至9中任一项所述的菌株和/或制剂,和/或至少一种如权利要求11至13中任一项所述的组合物的步骤。

具有益生菌活性的地衣芽孢杆菌菌株

[0001] 本发明涉及一种具有强产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 抑制作用的新型地衣芽孢杆菌菌株及其作为益生菌的用途。

[0002] 地衣芽孢杆菌菌株作为饲料工业中的益生菌成分的用途为现有技术所周知。益生菌 (也称为“直接饲喂微生物”或“DFM”) 的功能为以积极方式通过支持有益细菌的生长和/或抑制病原菌生长来影响肠道微生物群落。理想上, 通过使用益生菌而使得使用抗生素生长促进剂 (APG) 变得多余。但除此之外, 理想上益生菌还需要实现其他功能, 如帮助消化特定的饲料成分。

[0003] 因此, 鉴于现有技术, 需要益生菌能以积极方式影响肠道微生物群落且除此之外, 理想上实现至少一种其他功能。

[0004] 令人惊讶地发现根据本发明的细菌表现出许多有利的特性。除了其抑制产气荚膜梭菌 (家禽的主要的商业相关病原体) 生长的能力外, 它们在胆汁的存在下尤其显示出非常高的增殖率并以非常有效的方式来协助消化纤维素。

[0005] 已通过筛选天然产生的分离菌株而鉴定出了地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) DSM 32314。其已于2016年5月12日根据国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约的规定, 以Evonik Degussa GmbH的名义依如上所述的登录号保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ)。根据其系统发生和表型特征, 地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314也可能被分类为副地衣芽孢杆菌 (*B. paralicheniformis*) (s. Dunlap等人 (2015), *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 3487-3492)。

[0006] 因此, 本发明的第一个主题为选自下列组的地衣芽孢杆菌菌株和/或所述地衣芽孢杆菌菌株的制剂:

[0007] a) 以编号DSM 32314保藏在德国微生物菌种保藏中心的地衣芽孢杆菌菌株;

[0008] b) 保藏编号为DSM 32314的地衣芽孢杆菌菌株的突变株, 该突变株具有菌株DSM 32314的所有识别特征, 其中所述突变株优选与菌株DSM 32314具有至少95%、优选至少96%、97%或98%, 更优选至少99%或99.5%的DNA序列相同性;

[0009] c) (a) 或 (b) 的制剂;

[0010] d) 含有如 (a)、(b) 或 (c) 所含有的代谢产物的有效混合物的制剂。

[0011] 以DSM 32314保藏在德国微生物菌种保藏中心的地衣芽孢杆菌菌株表现出下列特征序列:

[0012] a) 与根据SEQ ID NO:1的多核苷酸序列具有至少99.5%、最优选100%的序列相同性的16S rDNA序列;

[0013] b) 与根据SEQ ID NO:2的多核苷酸序列具有至少99.5%、最优选100%的序列相同性的yqfD序列;

[0014] c) 与根据SEQ ID NO:3的多核苷酸序列具有至少99.5%、最优选100%的序列相同性的gyrB序列;

[0015] d) 与根据SEQ ID NO:4的多核苷酸序列具有至少99.5%、最优选100%的序列相同性的rpoB序列;

[0016] e) 与根据SEQ ID NO:5的多核苷酸序列具有至少99.5%、最优选100%的序列相同性的groEL序列。

[0017] 因此,本发明的另一个主题为地衣芽孢杆菌菌株或其制剂,尤其是具有如前述特征的地衣芽孢杆菌菌株,其显现出至少一种,优选所有下列特征:

[0018] a) 与根据SEQ ID NO:1的多核苷酸序列具有至少99%、优选至少99.5%、更优选至少99.8%或99.9%,最优选100%的序列相同性的16S rDNA序列;

[0019] b) 与根据SEQ ID NO:2的多核苷酸序列具有至少99%、优选至少99.5%、更优选至少99.8%或99.9%,最优选100%的序列相同性的yqfD序列;

[0020] c) 与根据SEQ ID NO:3的多核苷酸序列具有至少99%、优选至少99.5%、更优选至少99.8%或99.9%,最优选100%的序列相同性的gyrB序列。

[0021] 优选地,该地衣芽孢杆菌菌株表现出至少一种,更优选地表现出所有下列其他特征:

[0022] d) 与根据SEQ ID NO:4的多核苷酸序列具有至少99%、优选至少99.5%、更优选至少99.8%或99.9%,最优选100%的序列相同性的rpoB序列;

[0023] e) 与根据SEQ ID NO:5的多核苷酸序列具有至少99%、优选至少99.5%、更优选至少99.8%或99.9%,最优选100%的序列相同性的groEL序列。

[0024] 因此,本发明的特定主题还涉及表现出下列特征的地衣芽孢杆菌菌株:

[0025] a) 根据SEQ ID NO:1的16S rDNA序列;

[0026] b) 根据SEQ ID NO:2的yqfD序列;

[0027] c) 根据SEQ ID NO:3的gyrB序列。

[0028] 优选地,该地衣芽孢杆菌菌株表现出下列其他特征:

[0029] d) 根据SEQ ID NO:4的rpoB序列;

[0030] e) 根据SEQ ID NO:5的groEL序列。

[0031] 优选地,本发明的菌株由至少一种,更优选地由所有下列其他特征表征:

[0032] 优选地,它们能在厌氧条件下生长。此外,优选地,它们能在该厌氧条件下降解水不溶性纤维素。

[0033] 优选地,它们非常有效地抑制感染性细菌,尤其是产气荚膜梭菌。特别是,优选地,它们的特征在于在孔扩散拮抗测定中,在LBKelly琼脂板上相对于产气荚膜梭菌菌株ATCC13124的病原体清除为至少10mm,更优选为至少13mm。

[0034] 优选地,该孢子可在低pH下存活,且优选地,可在暴露于低至4.0、特别是低至3.0、优选低至2.0的pH后存活至少1小时。

[0035] 优选地,根据本发明的菌株的特征还在于能在0.05重量%醋酸、0.05重量%丙酸和/或0.2重量%乳酸的存在下生长。

[0036] 优选地,它们的特征还在于具有至少200mU/mL、更优选至少230mU/mL、最优选约250mU/mL的纤维素酶活性,至少10mU/mL、更优选至少15mU/mL、最优选约20mU/mL的木聚糖酶活性,和/或至少6mU/mL、更优选至少8mU/mL、最优选约10mU/mL的蛋白酶活性。

[0037] 优选地,根据本发明的地衣芽孢杆菌菌株的特征还在于能在2mM胆汁、更优选4mM胆汁的存在下生长。特别是,优选地,它们的特征分别在于在2mM胆汁的存在下,AUC5性能值为至少0.3、优选至少0.4、最优选至少0.5,特别是约0.54,且AUC10性能值为至少1.5、优选

至少1.75、最优选至少2.0,特别是约2.1。

[0038] 另外,优选地,该菌株能在高盐条件下,特别在10重量%的NaCl的存在下生长至少一天。

[0039] 此外,优选地,本发明的菌株在用于粒化动物饲料所需的高温下存活,特别是优选地,它们在80℃的温度下存活至少20分钟。

[0040] 由于根据本发明的菌株也可被分类为副地衣芽孢杆菌(*B.paralicheniformis*),本发明的另一主题也为具有前述特征的副地衣芽孢杆菌菌株及其制剂。

[0041] 不欲受任何理论束缚,根据本发明的地衣芽孢杆菌菌株被认为通过多方面作用模式来增进动物健康,包括产生具有选择性功效的代谢产物及通过消耗较多的可用营养物来与病原菌竞争,从而在肠道内有效抑制病原菌的建立。

[0042] 与抗生素相比较,益生菌的重要优势在于它们不会无差别地破坏细菌也不会导致病原菌菌株的抗生素抗性。通常,它们能通过产生具特定功效的抗微生物物质来选择性地与病原菌竞争,且理想上能同时增强有益的肠道微生物群落的生长和存活力。此外,优选地,它们能刺激受治疗的动物的全身性免疫反应。

[0043] 本发明的DSM 32314的突变菌株优选为自发性突变体。术语“自发性突变体”是指从DSM 32314产生而不刻意使用诱变剂的突变体。该自发性突变体可通过经典方法获得,诸如使地衣芽孢杆菌菌株在UV光的存在下或容易影响亲本菌株的某种抗生素的存在下生长并测试具有提升的生物学活性或提升的增进动物的一种或多种健康指标的能力的任何抗性突变体。对于本领域一般技术人员来说,已知还有其他用于鉴定自发性突变体的方法。但是除了这些优选的自发性突变体外,DSM 32314的所有其他种类的突变体,例如通过遗传工程化获得的突变体也包含在本发明内。

[0044] 本发明的一种特定实施方案为通过如前述的特征表征的菌株DSM 32314的非天然产生的突变体。

[0045] 在本发明的优选实施方案中,本发明的菌株和制剂优选口服施用于动物或人类。

[0046] 因此,本发明的另一主题为含有本发明的地衣芽孢杆菌菌株和/或制剂的组合物,诸如饲料、食物、饮用水和饲养用水及治疗性组合物。

[0047] 本发明的另一主题为本发明的地衣芽孢杆菌菌株和/或制剂用作饲料或食物产品的益生菌成分(DFM)的用途。

[0048] 本发明还有另一主题为地衣芽孢杆菌菌株和/或其制剂用作饲料或食物产品的益生菌成分(DFM)的用途。

[0049] 根据本发明的优选食物为乳制品、特别是酸奶、乳酪、乳汁、奶油和夸克(quark)。

[0050] 特别是在本发明的化合物中的本发明的菌株的细胞可以孢子(其为休眠的)、营养细胞(其为正在生长)、过渡状态细胞(其为从生长阶段过渡到孢子形成阶段)或至少二种形式的组合、特别是所有这些类型的细胞的组合存在。在优选的实施方案中,本发明的组合物主要包含或仅包含孢子。

[0051] 当施用于动物时,本发明的地衣芽孢杆菌菌株及含有其的组合物优选增进该动物的健康和/或改善该动物的一般身体状况和/或改善该动物的饲料转化率和/或降低该动物的死亡率和/或增加该动物的存活率和/或改善该动物的增重和/或提高该动物的生产率和/或增加该动物的疾病抵抗力和/或增加该动物的免疫反应和/或建立或维持该动物的健

康肠道微生物群落和/或减少通过该动物粪便脱落病原体。特别是,本发明的菌株和组合物可在施用用于治疗目的的抗生素后用于协助重新建立肠道微生物群落的健康平衡。

[0052] 因此,本发明的另一主题为增进动物的健康和/或改善动物的一般身体状况和/或改善动物的饲料转化率和/或降低动物的死亡率和/或增加动物的存活率和/或改善动物的增重和/或提高动物的生产率和/或增加动物的疾病抵抗力和/或增强动物的免疫反应和/或建立或维持动物的健康肠道微生物群落和/或减少通过动物粪便脱落病原体的方法,其中是给予动物本发明的菌株和/或制剂或包含该等菌株的本发明的组合物。

[0053] 因此,本发明还有另一主题为本发明的菌株和/或制剂和/或组合物用于增进动物的健康和/或改善动物的一般身体状况和/或改善动物的饲料转化率和/或降低动物的死亡率和/或增加动物的存活率和/或改善动物的增重和/或提高动物的生产力和/或增加动物的疾病抵抗力和/或增强动物的免疫反应和/或建立或维持动物的健康肠道微生物群落和/或减少通过动物粪便脱落的病原体的用途,其中是将本发明的菌株和/或制剂或包含该等菌株的本发明的组合物施用于动物。

[0054] 因此,本发明还有另一主题为如前述的本发明的菌株和制剂及含有该菌株的本发明的组合物,其用于增进动物的健康和/或改善动物的一般身体状况和/或改善动物的饲料转化率和/或降低动物的死亡率和/或增加动物的存活率和/或改善动物的增重和/或提高动物的生产率和/或增加动物的疾病抵抗力和/或增强动物的免疫反应和/或建立或维持动物的健康肠道微生物群落和/或减少通过动物粪便脱落病原体。

[0055] “提高动物的生产率”特别指下列任一者:产生更多或品质更好的蛋、乳汁或肉或增加断奶后代的产量。

[0056] 本发明的菌株、制剂和组合物的方法和用途可为治疗性的或非治疗性的。在本发明的特别优选的实施方案中,所述方法和用途为非治疗性的,尤其是饲养应用。

[0057] 由于未经处理的动物粪肥因为病原菌及其他成分而可能具有危害环境的作用,尤其是对于动物本身和/或与粪肥接触的人类,这可通过喂食动物本发明的菌株、组合物或制剂或直接用本发明的菌株、组合物或制剂处理动物的粪肥或住所来避免,因此,本发明的另一主题为控制和/或避免粪肥或受污染的液体的危害环境作用的方法,该方法包含将根据本发明的至少一种菌株、一种制剂和/或一种组合物应用在粪肥、受污染的液体、褥草、陷坑或粪池中的步骤。优选地,该组合物是以液体形式(例如通过喷雾),或以粉末形式(例如通过散播)施用。

[0058] 由于有害细菌可能对褥草的一致性产生负面影响,且特别是可能影响更多流体或高流体的褥草,这可能导致家禽的足垫损伤,且这可通过向动物喂食本发明的菌株、组合物或制剂来避免,因此本发明的另一主题为控制和/或改善褥草的一致性的方法,尤其是确保褥草的固体一致性的方法和/或避免足垫损伤的方法,该方法包含喂食动物(特别是家禽)根据本发明的至少一种菌株、一种制剂和/或一种组合物的步骤。

[0059] 根据本发明的菌株和制剂也可用于改善水的质量。因此,本发明的另一主题为控制和/或改善水或水溶液,特别是饮用水和/或饲养用水的质量的方法,其包括将根据本发明的至少一种菌株和/或至少一种制剂和/或至少一种组合物施用于水或水溶液的步骤。

[0060] 此外,根据本发明的菌株和制剂也可用于治疗植物的微生物疾病。因此,本发明的另一主题为治疗和/或预防植物、特别是栽培的植物的微生物疾病的方法,其包括将根据本

发明的至少一种菌株和/或至少一种制剂和/或至少一种组合物施用于植物的步骤。所述施用可以液体形式,诸如通过喷雾进行或以固体形式,特别是粉末进行。

[0061] 优选地,通过使用本发明的菌株、制剂和组合物实现改善至少一种如上所述的特征,其中优选地,该特性的实现意指与适当的阴性对照相比较,改善至少1%、更优选至少3%或至少5%。虽然可使用畜牧业领域中已知的阴性对照平均值,但优选使用接受与受试动物相同处理,但不施用本发明的菌株和/或制剂的作为阴性对照动物。

[0062] 特别地,可将能有效抑制和/或减少动物肠道中的病原菌生长的量的本发明的菌株、制剂和组合物施用于或喂食动物。该病原菌包括梭菌属、李斯特氏菌属 (*Listeria*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、肠球菌属 (*Enterococci*)、葡萄球菌属 (*Staphylococci*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、链球菌属 (*Streptococci*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、大肠杆菌 (*Escherichiacoli*) 和弧菌属 (*Vibrio*)。相对地,本发明的方法可用于减少动物粪便中脱落的病原菌的量。本发明的方法也可用于维持或增加动物肠道中有益细菌 (诸如乳酸菌) 的生长。通过减少病原菌和/或增加或维持有益细菌,本发明的组合物能维持整体健康的肠道微生物群落。

[0063] 因此,本发明的另一主题为抑制和/或减少动物肠道中有害细菌或病原菌的生长和/或维持和/或增加有益细菌的生长的方法,其中将本发明的菌株和/或制剂和/或组合物施用于动物且其中所述病原菌优选选自梭菌属 (特别是产气荚膜梭菌 (*C.perfringens*) 和艰难梭菌 (*C.difficile*))、李斯特菌属 (特别是单增李斯特菌 (*L.monocytogenes*)、斯氏李斯特菌 (*L.seeligeri*) 和威氏李斯特菌 (*L.welshimeri*))、沙门氏菌属 (特别是肠道沙门氏菌 (*S.enterica*)、鸡沙门氏菌 (*S.gallinarum*)、鸡白痢沙门氏菌 (*S.pullorum*)、亚利桑那沙门氏菌 (*S.arizonae*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S.typhimurium*)、肠炎沙门氏菌 (*S.enteritidis*) 和邦戈尔沙门氏菌 (*S.bongori*))、肠球菌属 (特别是粪肠球菌 (*E.faecalis*)、屎肠球菌 (*E.faecium*) 和盲肠肠球菌 (*E.cecorum*))、葡萄球菌属 (特别是金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*))、气单胞菌属、链球菌属 (特别是猪链球菌 (*S.suis*) 和鸡链球菌 (*S.gallinaceus*))、弯曲杆菌属 (特别是空肠弯曲杆菌 (*C.jejuni*) 和大肠弯曲杆菌 (*C.coli*))、大肠杆菌和弧菌属 (特别是副溶血性弧菌 (*V.parahemolyticus*) 和哈氏弧菌 (*V.harveyi*)), 且优选地,有益细菌选自乳酸菌,特别是选自乳酸杆菌和双歧杆菌 (*Bifidobacteria*)。

[0064] 在本发明的优选实施方案中,至少一种病原菌 (特别是产气荚膜梭菌) 的量减少至少0.5log,更优选减少至少1log、2log或3log。

[0065] 因此,本发明的另一主题为用于抑制和/或减少动物肠道中病原菌生长和/或维持和/或增加有益细菌生长的本发明的菌株、制剂和组合物,其中所述病原菌优选选自梭菌属 (特别是产气荚膜梭菌和艰难梭菌)、李斯特菌属 (特别是单增李斯特菌、斯氏李斯特菌和威氏李斯特菌)、沙门氏菌属 (特别是肠道沙门氏菌、鸡沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和邦戈尔沙门氏菌)、肠球菌属 (特别是粪肠球菌、屎肠球菌和盲肠肠球菌)、葡萄球菌属 (特别是金黄色葡萄球菌)、气单胞菌属、链球菌属 (特别是猪链球菌和鸡链球菌)、弯曲杆菌属 (特别是空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌)、大肠杆菌和弧菌属 (特别是副溶血性弧菌和哈氏弧菌), 且优选地,有益细菌选自乳酸菌,特别是选自乳酸杆菌和双歧杆菌。

[0066] 病原菌的出现和/或增加的生长确实导致或可能导致某些疾病的爆发。例如产气荚膜梭菌的出现和/或增加的生长可导致家禽的肠道疾病爆发,特别是导致坏死性肠炎的爆发。产气荚膜梭菌的出现和/或增加的生长也可能导致其他疾病(如细菌性肠炎、坏疽性皮炎和胆管性肝炎(colangiohepatitis))的爆发。即使是由产气荚膜梭菌造成的最温和型感染也可能伴随腹泻,导致褥草潮湿,且由此可能导致继发性疾病,如足垫皮炎。

[0067] 因此,本发明的另一主题还在于包含如前述的本发明的菌株和/或组合物的治疗性组合物。

[0068] 因此,在此背景下的优选主题为用于在动物(优选家禽)中治疗和/或预防坏死性肠炎,特别是亚临床坏死性肠炎的治疗性组合物,治疗性组合物包含如前述的本发明的菌株和/或组合物。

[0069] 因此,在此背景下,另一优选主题为用于治疗和/或预防动物(优选家禽)的细菌性肠炎、坏疽性皮炎、胆管性肝炎、梭菌性疾病(clostridiosis)、腹泻和/或足垫皮炎的治疗性组合物,该治疗性组合物包含如前述的本发明的菌株和/或组合物。

[0070] 因此,本发明的另一主题为治疗和/或预防家禽的疾病,特别是肠道疾病,优选坏死性肠炎,特别是亚临床坏死性肠炎,其中向有需要治疗和/或预防疾病的动物施用本发明的菌株和/或组合物和/或制剂。

[0071] 因此,本发明的另一主题还在于治疗和/或预防选自以下的疾病(优选为家禽的疾病):细菌性肠炎、坏疽性皮炎、胆管性肝炎、梭菌性疾病、腹泻和/或足垫皮炎,其中向有需要治疗和/或预防疾病的动物施用本发明的菌株和/或组合物和/或制剂。

[0072] 本发明的菌株和/或制剂和/或组合物可在动物的整个生命期间或在动物生命的特定阶段或部分生命期间在饲料和/或饮用水中在数天之间施用于动物。例如,该菌株和/或组合物可仅施用在农场动物的起始饮食(starter diet)中或仅施用在农场动物的终期饮食(finisher diet)中。

[0073] 本发明还有一特定主题为增进人类健康和/或改善人类的一般身体状况和/或增加人类的疾病抵抗力和/或增加人类的免疫反应和/或建立或维持人类的健康肠道微生物群落的方法,其中是向人类施用本发明的菌株和/或制剂或包含该菌株的本发明的组合物。

[0074] 因此,本发明的另一主题还为本发明的菌株和/或制剂和/或组合物用作增进人类健康和/或改善人类的一般身体状况和/或增加人类的疾病抵抗力和/或增加人类的免疫反应和/或建立或维持人类的健康肠道微生物群落的用途,其中向人类施用本发明的菌株和/或制剂或包含该菌株的本发明的组合物。

[0075] 本发明的组合物,特别是饲料、食物和药物组合物及饮用或饲养用水,优选包含本发明的菌株并以约 1×10^3 至约 2×10^{12} CFU/g饲料或ml水的速率施用于动物,特别以约 1×10^3 、或约 1×10^4 、或约 1×10^5 、或约 1×10^6 、或约 1×10^7 、或约 1×10^8 、或约 1×10^9 、或约 1×10^{10} 、或约 1×10^{11} 、或约 1×10^{12} CFU/g饲料或ml水的速率施用于动物,优选以约 1×10^4 至约 1×10^{10} CFU/g饲料或ml水的量,更优选以 1×10^4 至 1×10^7 CFU/g饲料或ml水的量施用于动物。

[0076] 相对地,本发明的饲料、食物和水组合物中的本发明的菌株和/或制剂的优选量优选为0.1重量%至10重量%、更优选0.2重量%至5重量%、特别是0.3重量%至3重量%。

[0077] 本发明的方法可用于所有种类的动物,特别是所有种类的非人和非昆虫动物,更优选地用于所有种类的脊椎动物(诸如哺乳动物、水生动物和鸟类)。

[0078] 可受益于本发明的动物包括但不限于农场动物、宠物、野外动物、动物园动物、水生动物、运动、娱乐或工作用的动物。

[0079] 优选地,宠物选自狗、猫、家养鸟类及家养野外动物。

[0080] 优选地,水生动物选自鱼类和甲壳类动物,这些水生动物优选意图用于人类营养。特别是,这些包括鲤鱼、罗非鱼、鲶鱼、金枪鱼、鲑鱼、鳟鱼、尖吻鲈(barramundi)、鲷鱼、鲈鱼、鳕鱼、虾、龙虾、螃蟹、明虾及小龙虾。在此背景下,优选的鲑鱼类型为大西洋鲑、红鲑、樱花钩吻鲑(masu salmon)、帝王鲑、凯塔鲑(keta salmon)、银鲑、多瑙河鲑(Danube salmon)、太平洋鲑和粉红鲑。

[0081] 更优选的水生动物为随后加工以制成鱼粉或鱼油的养殖鱼类。在这方面,优选地,该鱼类为鲱鱼、绿鳕(pollack)、油鲱(menhaden)、鳀鱼、毛鳞鱼(capelin)或鳕鱼。

[0082] 在更优选的实施方案中,该动物为被饲养以供消费或作为食物生产者(诸如家禽、猪和反刍动物)的养殖鱼类。

[0083] 该家禽可选自生产性家禽或家养的家禽,但也可选自观赏家禽或野禽。

[0084] 在此背景下,优选的生产性家禽为鸡、火鸡、鸭和鹅。在此背景下,该生产性牲畜优选为经优化以生产幼畜的家禽或经优化以提供肉类的家禽。

[0085] 优选的观赏家禽或野禽为孔雀、雉鸡、鹌鹑、欧石鸡、珍珠鸡、鹧鸪、雷鸟、松鸡、鸽子和天鹅,特别优选的是鹧鸪。

[0086] 更优选的家禽为平胸鸟类,特别是鸵鸟和鸸鹋,及鸮鹑。

[0087] 根据本发明的反刍动物优选选自牛、山羊和绵羊。在一种实施方案中,本发明的组合物可喂食反刍前动物以增进其健康,且特别是降低这些动物腹泻的发生率。反刍前动物为反刍动物,包括年龄从出生到约十二周的犊牛。

[0088] 本发明的组合物可包含至少一种载体或典型的饲料成分或其组合。

[0089] 合适的载体为经添加以提升回收率、功效或物理性质和/或协助包装和施用的惰性制剂成分。该载体可单独或组合添加。这些载体可选自抗结块剂、抗氧化剂、填充剂和/或保护剂。有用的载体的实例包括多醣(特别是淀粉、麦芽糊精、甲基纤维素、树胶、壳聚糖和/或菊糖)、蛋白质来源(特别是脱脂奶粉和/或甜乳清粉)、肽、糖(特别是乳糖、海藻糖、蔗糖和/或右旋糖)、脂质(特别是卵磷脂、植物油和/或矿物油)、盐(特别是氯化钠、碳酸钠、碳酸钙、白垩、石灰石、碳酸镁、磷酸钠、磷酸钙、磷酸镁和/或柠檬酸钠)和硅酸盐(特别是黏土,尤其是沸石黏土(beolite clay)、无定形二氧化硅、烟雾二氧化硅(fumed silica)/沉淀的二氧化硅、沸石、富勒土、baylith、clintpolite、蒙脱石、硅藻土、滑石、膨润土和/或硅酸盐,如硅酸铝、硅酸镁和/或硅酸钙)。在美国饲料管制协会(American Feed Control Officials, Inc.)每年出版的官方出版物中,阐述了用于动物饲料添加剂的合适载体。参见例如由Sharon Krebs编辑的2006版的美国饲料管制协会官方出版物,其ISBN为1-878341-18-9。载体可在浓缩发酵肉汤之后和/或干燥期间和/或干燥之后加入。根据本发明的优选载体是选自碳酸钙、硅藻土和植物油。

[0090] 本发明的优选实施方案为浓缩组合物,特别是饲料添加剂组合物,即,适合用于制备饲料组合物的组合物,其包含至少一种如前述的本发明的菌株和至少一种载体,优选地,其中该至少一种菌株的含量为0.1至10重量%、更优选0.2至5重量%、特别是0.3至3重量%、最优选0.4至2.2重量%,且优选地,该至少一种载体的含量为至少90重量%、优选90

至99.9重量%、更优选95至99.8重量%、特别是97至99.7重量%、最优选97.8至99.6重量%，且优选地，其中所述载体基本上是由石灰石，特别是具有较少部分的硅藻土和/或植物油的石灰石组成的。

[0091] 本发明的这些含有稳定化的菌株的优选组合物可用于饲料和药物组合物制剂及饮用和饲养用水的制备，优选地包含如前述说明书中所提及的量的根据本发明的菌株。在优选的实施方案中，每吨饲料、饮用水或饲养用水使用200至1000克的该浓缩组合物，特别是250、500或1000克该浓缩组合物以提供可用于喂养动物的组合物。优选地，这些浓缩组合物包含至少一种本发明的菌株，其含量为每克该浓缩组合物包含 1×10^9 至 2×10^{11} CFU，特别是 2×10^9 至 1×10^{11} CFU的本发明菌株。

[0092] 从这些浓缩组合物开始，饲料和食物组合物可通过分别将浓缩组合物与典型的饲料或食物成分混合来制备。

[0093] 可包含在根据本发明的组合物中和/或用于从根据本发明的浓缩组合物开始的饲料组合物的制备合适的典型动物饲料成分包括下列之一或更多者：蛋白质、碳水化合物、脂肪、其他益生菌、益生元、酶、维生素、免疫调节剂、乳汁替代物、矿物质、氨基酸、抗球虫药、基于酸的产品和/或药物，诸如抗生素。

[0094] 可根据本发明使用的含有碳水化合物的组分为，例如牧草、粗饲料、小麦粉、葵花籽粕或大豆粉及其混合物。

[0095] 可根据本发明使用的含有蛋白质的组分为，例如大豆蛋白、豌豆蛋白、小麦麸或玉米麸及其混合物。

[0096] 可根据本发明使用的含有脂肪的组分为，特别是动物和植物两种来源的油，如植物油，例如大豆油、菜籽油、葵花籽油、亚麻籽油或棕榈油、鱼油及其混合物。

[0097] 可根据本发明使用的另外含有脂肪的含有蛋白质的组分为，例如鱼粉、磷虾粉、双壳粉、乌贼粉或虾壳及其混合物。

[0098] 可根据本发明与本发明的菌株和制剂组合使用的其他益生菌 (DFM) 优选选自以下物种的细菌：枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、侧孢芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、阿列维芽孢杆菌 (*Bacillus alevi*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、栗褐芽孢杆菌 (*Bacillus badius*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 和乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。优选的实例为枯草芽孢杆菌 DSM 32315 (如 2016 年 5 月 12 日根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的规定而保藏于德国微生物菌种保藏中心) 及其衍生物、由 Kemin 销售，商标为 **CLOSTAT®** 的枯草芽孢杆菌 PB6 (如美国专利号 7,247,299 中所描述并以 ATCC 登录编号 PTA-6737 所保藏的)、由 Calpis 销售，商标为 **CALSPORIN®** 的枯草芽孢杆菌 C-3102 (如美国专利号 4,919,936 中所描述并以 FERM BP-1096 保藏于日本工业科学和技术机构发酵研协会)、由 Chr. Hansen 销售，商标为 **GalliPro®** 的枯草芽孢杆菌 DSM 17299、由 Chr. Hansen 销售，商标为 **GalliProTect®** 的枯草芽孢杆菌 DSM 17299 和地衣芽孢杆菌 DSM 17236 的混合物、由 Chr. Hansen 销售，商标为 **BIOPPLUS2B®** 的地衣芽孢杆菌孢子和枯草芽孢杆菌孢子的混合物或如美国专利号 6,849,256 中所描述的凝结芽孢杆菌菌株。其他非芽孢杆菌属益生菌，诸如酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)或汉逊酵母属(*Hansenula*)也可用于本发明的组合物中。特别是,可用于食物组合物中的其他已知对人体健康有益的益生菌有,诸如产乳酸的细菌,特别是乳杆菌或双歧杆菌。若该其他益生菌未被配制成本发明的组合物的一部分,则其可与本发明的组合物一起施用(无论是同时施用或在不同时间施用)。

[0099] 可根据本发明使用的益生元优选寡糖,特别是选自下列组:半乳寡糖、唾液酸寡糖(silayl oligosaccharide)、乳果糖、乳蔗糖、果寡糖、帕拉金糖(palatinose)或异麦芽糖寡糖、糖基蔗糖、麦芽寡糖、异麦芽寡糖、环糊精、龙胆寡糖、大豆寡糖、木寡糖、葡聚糖、果胶、多聚半乳糖醛酸聚糖(polygalacturonan)、鼠李半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan)、甘露聚糖、半纤维素、阿拉伯半乳糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯糖木聚糖(arabinoxylan)、抗性淀粉、蜜二糖(mehbiose)、壳聚糖、琼脂糖、菊糖、塔格糖(tagatose)、聚右旋糖及藻酸盐。

[0100] 可用于根据本发明的饲料组合物中并可协助消化饲料的酶优选选自:植酸酶(EC3.1.3.8或3.1.3.26)、木聚糖酶(EC3.2.1.8)、半乳聚糖酶(EC3.2.1.89)、半乳糖苷酶(特别是 α -半乳糖苷酶(EC3.2.1.22)、蛋白酶(EC3.4))、磷脂酶(特别是磷脂酶A1(EC3.1.1.32)、A2(EC3.1.1.4)、C(EC3.1.4.3)和D(EC3.1.4.4))、溶血磷脂酶(EC3.1.1.5)、淀粉酶(特别是 α -淀粉酶(EC3.2.1.1))、溶菌酶(EC3.2.1.17)、葡聚糖酶(特别是 β -葡聚糖酶(EC3.2.1.4或EC3.2.1.6))、葡糖淀粉酶、纤维素酶、果胶酶或其任何混合物。

[0101] 市售的植酸酶(phytase)的实例包括Bio-FeedTM植酸酶(诺维信公司)、Ronozyme[®] P和HiPhosTM(DSM营养产品公司)、NatuphosTM(巴斯夫公司)、Finase[®]和Quantum[®]Blue(英联酶制剂有限公司)、Phyzyme[®]XP(范恩尼姆/杜邦公司)及Axta[®]PHY(杜邦公司)。其他优选的植酸酶包括例如在W0 98/28408、W0 00/43503和W0 03/066847中所描述的那些。

[0102] 市售的木聚糖酶的实例包括Ronozyme[®]WX和G2(DSM营养产品公司)、Econase[®]XT和Barley(AB Vista公司)、Xylathin[®](范恩尼姆公司)和Axta[®]XB(木聚糖酶/ β -葡聚糖酶,杜邦公司)。市售的蛋白酶的实例包括Ronozyme[®]ProAct(DSM营养产品公司)。

[0103] 可根据本发明使用的维生素为,例如维生素A、维生素D3、维生素E、维生素K(例如维生素K3)、维生素B12、生物素、胆碱、维生素B1、维生素B2、维生素B6、烟酸、叶酸和泛酸,例如Ca-D-泛酸盐或其组合。

[0104] 可使用的免疫调节剂为,例如抗体、细胞因子、喷雾干燥的血浆、白介素、或干扰素、或其组合。

[0105] 可根据本发明使用的矿物质为,例如硼、钴、氯化物、铬、铜、氟化物、碘、铁、锰、钼、硒、锌、钙、镁、钾、或钠、或其组合。

[0106] 可根据本发明使用的氨基酸为,例如赖氨酸、丙氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸、或其组合。

[0107] 因此,本发明的另外的实施方案为制备动物饲料组合物的方法,其包含将本发明的至少一种菌株和/或至少一种制剂和/或至少一种浓缩组合物(特别是以有效增进动物健康的量)与饲料成分,诸如蛋白质、脂质和/或碳水化合物及可选择的其他有益物质(优选如前述者)混合在一起以提供喂食产品。该方法也可包含,例如粒化步骤。

[0108] 可使用本领域技术人员已知的标准粒化过程,包括干燥或半湿饲料的挤出加工。优选的粒化温度为介于约65℃至约120℃之间。本发明的菌株和组合物可通过根据本领域所周知的方法(包括使用例如US6,060,051、EP0287699或US2014/0010792中所描述的培养基和其他方法)培养本发明的菌株来获得。常规的大规模微生物培养方法包括深层发酵、固态发酵或液体表面培养。发酵接近结束时,当营养物耗尽,该菌株的细胞开始从生长阶段过渡到孢子形成阶段,从而使发酵的终产物主要为孢子、代谢产物及剩余的发酵培养基。孢子形成为这些菌株的自然生命周期的一部分且通常是由该细胞响应于营养限制开始。设置发酵以获得高水平的地衣芽孢杆菌细胞菌落形成单位并促进孢子形成。培养基中从发酵产生的细菌细胞、孢子和代谢产物可直接使用或通过常规工业方法,诸如离心、切向流过滤、深层过滤和蒸发进行浓缩。所述浓缩的发酵肉汤可例如经由过滤过程洗涤以除去残余的发酵肉汤和代谢产物。

[0109] 所述发酵肉汤或肉汤浓缩物可添加或不添加载体使用常规的干燥过程或方法,诸如喷雾干燥、冷冻干燥、托盘干燥、流化床干燥、转鼓式干燥或蒸发进行干燥。所产生的干燥产物可进一步加工,诸如通过研磨或粒化,以取得特定的粒度或物理形式。也可在干燥后添加如上所述的载体。

[0110] 本发明的菌株的制剂可为无细胞制剂或含有细胞碎片的制剂或含有完整细胞和细胞碎片的混合物的制剂。本发明的菌株的无细胞制剂可例如通过将发酵肉汤离心和/或过滤来获得。根据所使用的技术,这些无细胞制剂可能并非完全不含细胞,而是可能仍然包含较少量的细胞。由于细胞向周围培养基分泌化合物(如代谢产物、酶和/或肽),所述细胞的上清液包含该等化合物的混合物,特别是由细胞分泌的代谢产物、酶和/或肽。因此,在本发明的优选实施方案中,该菌株的制剂为发酵肉汤的上清液。

[0111] 包含该菌株的细胞碎片的组合物可通过应用本领域技术人员已知的技术(例如通过机械手段或施加高压)破裂细胞来获得。根据施加的力度,获得仅包含破裂的细胞的组合物或包含细胞碎片和完整细胞的混合物的组合物。细胞均质化可通过例如下列方法实现:采用弗氏细胞压碎器、超音波仪(sonicator)、均质器、微射流机、球磨机、棒磨机、卵石球磨机、珠磨机、高压磨辊、立轴式冲击破碎机、工业混合器、高剪切混合器、桨式搅拌器和/或Polytron匀浆机。合适的替代方法为酶处理和/或化学处理该细胞。

[0112] 本发明的无细胞制剂还包含通过先应用如前述的技术破裂细胞,并随后移除细胞碎片和剩余的完整细胞来获得的制剂。移除细胞碎片和剩余完整细胞可通过,特别是,离心和/或过滤进行。

[0113] 本发明的菌株的制剂可包含至少一种代谢产物,优选代谢产物的混合物(如下文中进一步所描述的),和/或至少一种酶,其选自蛋白酶,特别是地衣素(lichenisin)、木聚糖酶和/或纤维素酶,和/或至少一种肽,和/或其组合作为活性化合物。

[0114] 含有如本发明的菌株中所包含和/或如前述的细胞制剂中所包含的代谢产物的有效混合物的制剂可例如根据美国专利号6,060,051中阐明的方法来获得。特别是,该制剂可通过使用有机溶剂(如醋酸乙酯)将如包含在所述的制剂中的代谢产物沉淀下来,并随后再将该沉淀的代谢产物重新溶解在适当的溶剂中来获得。接着可通过尺寸排阻过滤法来纯化该代谢产物,该尺寸排阻过滤法可基于分子量截断来将代谢产物分成不同部分。

[0115] 含有本发明的代谢产物的有效混合物的制剂优选包含本发明菌株的至少5种,更

优选至少6种、7种、8种、或9种,特别是所有代谢产物。表5.1中描述了菌株DSM 32314的代谢产物含量。该代谢产物优选具有介于400至3000道耳顿之间的分子量,更优选为介于450至2500道耳顿之间的分子量。

[0116] 优选地,根据本发明,本发明的实施方案中总是使用有效量的本发明的菌株和/或制剂和/或组合物。术语“有效量”是指与未施用本发明的菌株和/或制剂和/或组合物但施用除此之外的相同饮食(包括饲料和其他化合物)的动物相比较,使得产生至少一种对动物和/或环境有益的效果(特别是与前文已提及的特征相关者)的量。

[0117] 在治疗应用的情况下,优选使用本发明的菌株和/或制剂和/或组合物的治疗量。术语“治疗量”是指足以改善、逆转或预防动物的疾病状态的量。各种动物的最佳剂量水准可由本领域技术人员通过评估(与其他的一起)组合物的下列能力而容易地测定:(i)以各种剂量抑制或减少肠道中的病原菌,(ii)增加或维持有益细菌的水平和/或(iii)以各种剂量增进动物健康。

实施例

[0118] 实施例1.与在胃肠道中存活相关的菌株特征。

[0119] 从各种环境样品中筛选地衣芽孢杆菌菌株以获得作为直接饲喂动物的微生物(DFM)/益生菌的优良菌株。由于意图使菌株在靶动物的肠道内充分发挥其潜力,预先筛选菌株以使其耐受各种环境和肠道相关条件。产生菌株孢子(Nicholson和Setlow1990)、洗涤并在80℃温育20分钟(巴氏灭菌),然后使用小牛肉浸液肉汤琼脂(VI,Difco™,编号234420,Becton Dickinson公司,德国海德堡)以1:10对数稀释进行滴定。将没有生长之前的第二高稀释液储存于-80℃并作为所有从孢子状态开始的进一步评估的标准化起点。为了模拟胃通道(Argenzio2004a;Trampel和Duke2004),根据Larsen等人(2014)评估暴露于酸的存活。在在胃/前胃和肫的低pH指示生长的条件下及存在高达4mM胆汁(B8631,CAS8008-63-8,Sigma-Aldrich公司)的pH7下进一步评估营养细胞的生长以确认菌株在胃或肫廓清后不久在小肠近端部分的生长(Argenzio2004b;Trampel和Duke2004)。通过将标准化孢子溶液在厌氧条件(AnaeroPak™,赛默飞世尔科技公司)下接种在补充有2.5mM KNO₃的VI培养基(Glaser等人,1995)中来评估菌株在厌氧小肠(Argenzio2004b;Trampel和Duke2004)中的适应性。此外,在补充有1%脱脂奶粉(70166,西格玛奥德里奇公司)或0.1%水不溶性AZCL-HE纤维素(I-AZCEL,美格兹密国际公司,爱尔兰布雷市)的VI琼脂板上评估菌株的厌氧蛋白水解活性和纤维素分解活性。渗透压力(如亦在肠道中所发现的)(Argenzio2004b;Trampel和Duke2004)是通过在添加5%NaCl的VI琼脂(den Besten等人2009)上测定生长来进行评估。最后,通过将孢子暴露于99℃,20分钟(Palop等人1996)且随后接种在VI琼脂上来评估孢子的热稳定性以确定粒化稳定性。地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314在模拟的胃通道中存活,在pH 6开始观察到菌株DSM 32314的生长。菌株DSM 32314厌氧生长且能在厌氧条件下降解水不溶性纤维素。菌株DSM 32314能在2和4mM胆汁的存在下及10%NaCl的存在下生长。菌株DSM 32314达到 4.35×10^9 CFU/mL的平均孢子计数,且菌株DSM 32314的孢子在暴露于99℃,20分钟后能存活。此外,地衣芽孢杆菌野生型菌株WT1和WT2经评估厌氧生长并耐受pH 6的环境,但它们不能厌氧降解纤维素,且因此不适合作为DFM/益生菌的候选者。然而,它们作为下列实施例中的野生型对比。

[0120] 参考文献:

[0121] 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.

[0122] 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.

[0123] 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.

[0124] 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 14579cells.Appl Environ Microbiol.75:4111-9.

[0125] 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

[0126] 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.

[0127] 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.

[0128] 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.

[0129] 实施例2.比较相对于野生型地衣芽孢杆菌的菌株性能-胆汁耐受性的定量评估。

[0130] 为了评估选自实施例1的地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314的竞争性,通过与代表性地衣芽孢杆菌野生型1 (WT1) 和野生型2 (WT2) 比较进行分析,并通过在添加2mM胆汁的VIB培养基中生长菌株来确定在紧接在胃通道 (Argenzio2004b;Trampel和Duke2004) 后的近端小肠在中性pH的胆汁的存在下的菌株的就绪状态。将在100mL锥形瓶中的具有50μL候选菌株细胞悬浮液与10mL VIB的隔夜培养物在37℃和200rpm下温育,然后将约50μL的隔夜培养物转移到具有1mL VIB具有pH 7和2mM胆汁的100孔蜂窝板 (Oy Growth Curves Ab有限公司,前Thermo Labsystems,芬兰赫尔辛基) 中,以获得每mL的OD为0.2。观察在37℃和200rpm下的菌株特异性生长48小时,每15分钟使用Bioscreen C MBR与BioLink软件包 (Oy Growth Curves Ab有限公司) 测定OD。计算曲线下面积 (AUC) 之前,将各时间点的每一培养物的读数减去仅具有胆汁的肉汤 (空白组) 的一式三份空白OD的平均读数。以介于0-5h的曲线下面积 (AUC5,OD×时间 (以h计))、0-10h的曲线下面积 (AUC10,OD×时间 (以h计)) 及菌株达到其最大光密度的时间 (Tmax (以h计)) 比较各菌株的定量评估。使用Minitab®16统计软件 (Minitab公司,美国宾州州立学院) 的单因素ANOVA方法进行统计分析。结果可见于表2.1。

[0131] 表2.1.在2mM胆汁的存在下,地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314和野生型菌株WT1和WT2的生长。

[0132]

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

[0133] AUC5,介于时间点0和5h之间的曲线下面积,为光密度×h;AUC10,介于时间点0和10h之间的曲线下面积,为光密度×h;Tmax,以h计的达到最大光密度的时间;SEM,平均值的合并标准差;^{A,B}意指不同的字母是显著不同的。

[0134] 在直接比较中,在2mM胆汁的存在下,菌株DSM 32314较野生型地衣芽孢杆菌菌株WT1和WT2快10小时达到其最大OD。另外,菌株DSM 32314在测试的前5小时和前10小时的期间内分别较野生型地衣芽孢杆菌菌株的生长快1.4-2.0倍和1.8-3.0倍。

[0135] 参考文献:

[0136] 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.

[0137] 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.

[0138] 实施例3.比较相对于现有技术的用于动物营养的直接饲喂微生物 (DFM) / 益生菌的菌株性能-在短链脂肪酸 (SCFA) 的存在下生长。

[0139] 在短链脂肪酸的存在下评估菌株DSM 32314和WT1的生长比较,因为该短链脂肪酸在肠道中被观察到对大肠增加的重要性 (Argenzio2004b; Trampel和Duke2004)。使用如实施例1中描述的标准化的孢子溶液开始测试,在37℃和pH 6下测试需氧菌在VI培养基中的生长,读出参数为相对于不生长的生长。为了进行此测试,使用McIlvaine缓冲液 (Palop等1996) 将VI培养基调整至pH 6,并随后补充0.05%醋酸 (HA, 537020, CAS64-19-7, Sigma-Aldrich公司)、0.05%丙酸 (HP, P1386, CAS79-09-4, Sigma-Aldrich公司) 或0.2%乳酸 (HL, W261106, CAS50-21-5, Sigma-Aldrich公司)。结果可见于表3.1。

[0140] 表3.1.评估地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314和野生型菌株WT1在pH 6短链脂肪酸的存在下的生长。

[0141]

菌株ID	醋酸	丙酸	乳酸
DSM 32314	是	是	是
WT1	无生长	无生长	无生长

[0142] 地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314能在pH 6醋酸、丙酸和乳酸的存在下生长,而WT1菌

株不能在这些条件下从孢子阶段生长。

[0143] 参考文献:

[0144] 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.

[0145] 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.

[0146] 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.

[0147] 实施例4比较相对于现有技术的用于动物营养的直接饲喂微生物(DFM)/益生菌的菌株性能-酶活性的定量评估。

[0148] 类似于实施例2中进行的测试,评估相应的需氧菌的纤维分解、木聚糖分解和蛋白水解活性以比较菌株DSM 32314、WT1和WT2。依Larsen等人(2014)的描述测定纤维素酶和木聚糖酶活性。为蛋白水解活性分析,如前所述在37℃下,在VIB中生长菌株的初始培养物和主要培养物。从主要培养物取出10μL,将其加入20μL的0.5%异硫氰酸荧光素酪蛋白(FITC;C3777,Sigma-Aldrich公司)溶液与20μL缓冲液中,该缓冲液是由20mM磷酸钠(二盐基的,无水)与150mM氯化钠(所有组分均来自Sigma-Aldrich)所组成,然后在37℃下温育1小时。加入150μL的10%(v/v)三氯醋酸(Sigma-Aldrich公司)并在37℃下再温育30分钟后,将样品在19,000rpm离心15分钟,然后将2μL上清液转移到200μL的500mM TRIS HCl溶液(Trizma Base TRIS,Sigma-Aldrich公司)中。在激发波长494nm,发射波长518nm处测定由于蛋白水解出的可溶性肽的荧光(TECAN GENios Microplate Reader,Tecan集团有限公司,瑞士Männedorf)。在三个独立运作中进行分析,然后取每μL溶液的毫单位的平均值,使用Minitab®16统计软件(Minitab公司,美国宾州州立学院)的单因素ANOVA方法进行统计学分析。结果可见于表4.1。

[0149] 表4.1.地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314相较于野生型菌株WT1和WT2的纤维素酶、蛋白酶和木聚糖酶活性。

[0150]

菌株 ID	纤维素酶活性 (mU/mL)	蛋白酶活性 (mU/mL)	木聚糖酶活性 (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

[0151] SEM,平均值的合并标准差;A、B意指不同字母是显著不同的。

[0152] 在直接比较中,与WT2相比较菌株DSM 32314显示出,纤维素酶活性显著增加4.4倍。此外,与WT1相比较菌株DSM 32314显示出蛋白酶活性显著增加3.0倍,而与WT2相比较蛋白酶活性增加3.6倍。此外,与WT1和WT2相比较,菌株DSM 32314显示出木聚糖酶活性显著增加1.4倍。

[0153] 参考文献:

[0154] 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.

[0155] 实施例5.比较相对于现有技术的用于动物营养的直接饲喂微生物(DFM)/益生菌的菌株性能-代谢产物的表达和病原体抑制作用。

[0156] 类似于实施例2中进行的测试,评估在相应的培养基中表达的代谢产物和受抑制的病原体的相应数目以比较地衣芽孢杆菌菌株DSM 32314、WT1和WT2。在代谢产物表达分析方面,依Scholz等人(2011年)的描述生长起始培养物并进行测试。从在37℃和160rpm下,在100mL培养瓶中生长24小时的10mL Luria Bertami肉汤(LB,Thermo Fisher科技)培养物中取出100μL并转移至主要培养物中。将主要培养物在含有0.2mL/L KellyT微量金属溶液(LBKelly,Scholz等人2011)的10mL LB或具有0.6%酵母萃取物(Y1625,CAS8013-1-2,Sigma-Aldrich公司;所产生的肉汤缩写为TSBYE)的10mL胰蛋白酶大豆肉汤(Oxoid公司,Thermo Fisher Scientific)中生长,二者均是在100mL培养瓶中,在37℃,160rpm下生长24小时。将4mL的主要培养物与2mL的正丁醇在15mL试管中合并,震荡混合3分钟,然后超声处理15分钟。在5000rpm离心1分钟后,转移有机相,真空干燥并使用高性能液相色谱-电喷雾离子化质谱(HPLC-ESI-MS;Chen等人2006)进行分析。每份样品以二种不同模式(负离子模式和正离子模式)进行测量并取得质谱。将所产生的类似于Teo和Tan(2005)中报告的峰转换成以Da表示的分子质量。比较的结果可见于表5.1。

[0157] 表5.1.由菌株DSM32314、WT1和WT2分别表现在LBKelly中的代谢产物的比较。

[0158]

分子质量	→	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		yes	n/d	yes	n/d	n/d	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
WT1		n/d	yes	n/d	yes	yes	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	yes	yes	微量	n/d	n/d	n/d	n/d

[0159] (Yes:是)

[0160] 此外,使用孔扩散拮抗测试(Parente等人1995)评估经由制造地衣芽孢杆菌细菌素(其为来自表5.1.的代谢产物的一部分,但未经深入研究)来抑制产气荚膜梭菌。测试的四个致病性产气荚膜梭菌候选者为来自Teo and Tan (2005)的产气荚膜梭菌菌株ATCC 13124型及三个从德国波茨坦莱比锡大学兽医学院细菌学和真菌学教授Christoph Baums博士取得的来自家禽和猪的致病性产气荚膜梭菌原野分离株。来自莱比锡的产气荚膜梭菌A型菌株的描述如下:菌株2300-1-17和2300-1-18是从坏死性肠炎阳性的鸡的消化道分离出。二种菌株均产生 α 毒素,菌株2300-1-17也表达NetB毒素(Savva等人2013;Uzal等人2014),而菌株2300-1-18的 β 2毒素测试为阳性(Allaart等人2012)。菌株2300-1-19是从显示出A型梭菌肠炎症状的腹泻仔猪的消化道中分离出的(Songer和Uzal2005)。生长条件和培养基为Teo和Tan (2005)所描述的。简单地说,将芽孢杆菌菌株在37℃和160rpm,5%CO₂大气下,在100mL培养瓶中分别生长在10mL TSBYE和LBKelly起始培养物中24小时。将产气荚膜梭菌起始培养物以厌氧方式(AnaeroPak™, Thermo Fischer科学公司)在37℃和160rpm下,在100mL培养瓶中的流体巯基乙酸盐肉汤(FTB, Becton Dickenson)中培养24小时,然后以无菌棉签涂布在琼脂板上(具有1%琼脂的TSBYE,短TSAYE)。然后将经接种的TSAYE板在37℃下厌氧温育过夜,以取得产气荚膜梭菌菌苔。过夜生长的后,在铺有产气荚膜梭菌菌苔的琼脂中切出三个直径为9mm的孔,使用第1个孔作为不需培养的未经接种的对照组,在第2个孔中接种100 μ L的非产气荚膜梭菌抑制性芽孢杆菌菌株(日本蜡状芽孢杆菌, NCIMB 40112),第3个孔中接种100 μ L的地衣芽孢杆菌DSM 32314或DSM 17299起始培养物。在37℃下培育24小时后,测量从切割孔的边缘开始到清除的菌苔的边界以测定清除区域(以mm计),每一菌落测量两次(水平,垂直),然后将其平均。在每一地衣芽孢杆菌拮抗作用测试和培养基方面,以一式二份的板来进行分析。使用Minitab®16统计软体(Minitab公司,美国宾州州立学院)的单因素ANOVA方法进行统计分析,使用Fisher LSD来用于平均分隔,病原体(生长在LBKelly的菌株)的抑制结果可见于表5.2,病原体(生长在TSBYE的菌株)的抑制结果可见于表5.3中。

[0161] 表5.2.比较地衣芽孢杆菌DSM 32314和DSM 17299在致病性产气荚膜梭菌孔扩散测定(生长在LBKelly的菌株)的抑制能力,数值是以mm病原体清除表示。

[0162]

致病性产气荚膜梭菌→ (芽孢杆菌菌株 ↓)	家禽坏死性肠 炎 菌 株 2300-1-17	家禽坏死性肠 炎 菌 株 2300-1-18	猪梭菌肠炎菌株 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

[0163] SEM,平均值的合并标准差;A、B意指不同字母为显著不同。

[0164] 表5.3.比较地衣芽孢杆菌DSM 32314和DSM 17299在致病性产气荚膜梭菌孔扩散拮抗测定(生长在TSBYE的菌株)的抑制能力,数值是以mm病原体清除表示。

[0165]

致病性产气荚膜梭菌→ (芽孢杆菌菌株 ↓)	家禽坏死性肠 炎 菌 株 2300-1-17	家禽坏死性肠 炎 菌 株 2300-1-18	猪梭菌肠炎菌株 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

[0166] SEM,平均值的合并标准差;A、B意指不同字母为显著不同。

[0167] 参考文献:

[0168] 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

[0169] 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.

[0170] 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.

[0171] 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.

[0172] Scholz,R.,Molohon,K.J.,Nachtigall,J.,Vater,J.,Markley,A.L.,Süssmuth,

R.D., Mitchell, D.A. and Borriess, R. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology*, 193(1), 215-224.

[0173] Songer, J.G., and Uzal, F.A. (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 17(6), 528-536.

[0174] 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.

[0175] 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

[0176] 实施例6. 在印度饲养的喂食新型地衣芽孢杆菌或抗生素生长促进剂的肉仔鸡性能比较。

[0177] 以置于具有使用过的褥草的地面畜舍中的日龄、雄性 Vencobb400 小鸡 (Venkateshwara Hatcheries Pvt. 有限公司, 印度) 进行肉仔鸡生长性能研究。随机分配三种饮食治疗, 每一治疗重复18个畜舍, 每个畜舍含有25只鸡。以饮食治疗的其中一者分三个阶段喂食小鸡, 该三个阶段包含起始饮食 (1-14天)、生长饮食 (15-28天) 和终期饮食 (29-42天) 阶段。该基础饮食主要是以玉米-大豆粉为底质 (表6.1), 含有500g/MT的二硝甲苯甲酰胺 (dinotolmide) 以控制球虫病。基础饮食还包括4%肉和骨粉 (MBM) 作为额外的攻击, 因为 MBM 为肉仔鸡发展出由产气荚膜梭菌引起的坏死性肠炎的诱发因素 (M'Sadeqa 等人2015)。三种饮食治疗主要以玉米-大豆粉 (表6.1) 为底质且包括: 1. 基础对照 (对照组), 2. 对照+50g双水杨酸亚甲基杆菌肽 (Bacitracin Methylene Disalicyclate) /MT的饲料 (BMD), 3. 对照+250g地衣芽孢杆菌菌株 DSM 32314/MT饲料 (含有 2.0×10^9 cfu/g) (DSM 32314)。实验性治疗是在1-42天龄自由采食糊状的饲料。使用单因素ANOVA方法进行统计学分析并以 SAS vs9.4 (SAS Institute Inc., 美国) 进行LSD测试后分析。治疗对体重、饲料转化率和死亡率影响的结果报告于表6.2中。

[0178] 表6.1. 用于起始成长及终期阶段的基础饮食和饮食营养组成。

[0179]

成分, %	起始 (1-14d)	生长 (15-28d)	终期 (29-42d)
玉米	53.98	62.27	64.54
大豆粉, 48%CP	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
磷酸二钙	1.48	1.51	1.53
石灰石	0.39	0.45	0.16
预混物 (包括维生素-矿物质混合物)	0.65	0.65	0.65
氯化钠	0.28	0.29	0.29
碳酸氢钠	0.10	0.10	0.10

氯化胆碱50	0.10	0.10	0.10
DL-蛋氨酸	0.29	0.23	0.22
L-赖氨酸HCl	0.12	0.13	0.14
L-苏氨酸	0.05	0.04	0.05
营养组成			
ME,kcal/kg	2950	3050	3150
CP,%	23.50	20.08	18.83
Ca	1.00	1.00	1.00
可用的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

[0180] 表6.2.具有和不具有基于地衣芽孢杆菌的饲料添加剂或抗生素生长促进剂的饮食补充的动物在第0天至42天之间的性能。

[0181]

治疗	1-21 d		1-42 d	
	BW, g	FCR, g/g	BW, g	FCR, g/g
1.对照	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
相对%	2.8	-0.70	2.4	-1.14

[0183] BW,在指定期间的平均鸡体重;FCR,在指定期间的饲料对增重所计算出的饲料转化率;对照,在基础饮食中不含任何添加剂;BMD,在基础饮食中添加双水杨酸亚甲基杆菌肽的治疗饮食;DSM32314,在基础饮食中添加菌株DSM32314的治疗;差值,当将DSM 32314组与对照组相比较时所观察到的数值差异;相对%,以从对照组开始的变化百分比表示的DSM 32314组与对照组之间的差异。

[0184] 来自此肉仔鸡的数据表明与对照组相比较,两种产品,BMD和DSM 32314增进体重。然而,经预生产D组(pre-product group D)治疗的组分别在第21和42天具有最高平均重量,与对照组相比较分别增加24.5克和66.8克。同样地,BMD和DSM 32314两个治疗组在D21和D42的FCR均降低。此研究表明在这些条件下,与对照组相比较,DSM 32314能改善肉鸡的

FCR且至少与有效抗生素生长促进剂BMD同样有效,且甚至能达成取得所有组的最高平均体重。

[0185] 参考文献:

[0186] 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.

[0187] 实施例7:对于不同致病菌菌株的孔扩散拮抗作用测试

[0188] 以3种不同的病原体盲肠肠球菌DSM 20683、鸡链球菌(*Streptococcus gallinaceus*)DSM 15349和猪链球菌(*Streptococcus suis*)ATCC 43765进行孔扩散拮抗作用测试。

[0189] 已知盲肠肠球菌会导致肉鸡跛行、关节炎和骨髓炎,这些通常是由关节和/或骨组织发炎引起的。其他盲肠肠球菌可引起心包的炎症[Kense等人2011]。DSM 20683是从鸡盲肠分离出的。

[0190] 鸡链球菌可在家禽中造成败血症。肉眼损伤包括脾肿大、肝肿大、肾肿大和充血。亦在肝脏和脾脏中观察到与瓣膜性心内膜炎相关的多个区域坏死和/或梗死[Collins等人2002]。

[0191] 猪链球菌为猪的重要病原体且为仔猪断奶后引起败血症、脑膜炎和许多其他感染的最重要的细菌性死亡原因之一[Goyette-Desjardins等人2014]。ATCC 43765属于血清学组:R;血清型2且是从猪分离出的。

[0192] 将芽孢杆菌菌株在37℃和200rpm下,在100mL摇动培养瓶中的10mL TSBYE (30g/1 TSB+6g/1酵母萃取物)或LB-Kelly (LB-培养基,补充有DSMZ培养基1032的微量元素溶液)中生长16小时。将该致病菌株在合适的条件下以液体培养物形式生长直至在595nm的光密度至少为1,然后以无菌刮刀将100μl涂布在琼脂板的表面上。鸡链球菌是使用BHI琼脂板,盲肠肠球菌和猪链球菌是使用TSBYE琼脂板。在干燥的板内切出三个直径为9mm的孔。使用第1个孔作为不加培养物的未经接种的培养基对照组,在第2个孔中接种100μL的非抑制性芽孢杆菌菌株(日本蜡状芽孢杆菌(*B.cereus* var.*toyo*),NCIMB 40112),在第3个孔中接种100μL的枯草芽孢杆菌DSM 32315或DSM 17299培养物。在37℃,合适的条件下温育24小时后,测量从切割孔的边缘开始到清除区的边界以测定清除区域以mm计。每一菌落测量二次(水平,垂直),然后将其平均。结果可见于表7.1。

[0193] 表7.1:比较地衣芽孢杆菌DSM 32314和枯草芽孢杆菌DSM 17299在孔扩散拮抗测试中对致病菌菌株的抑制能力,数值是以mm病原体清除表示。

[0194]

病原体→ 益生菌↓	盲肠肠球菌 DSM 20683	鸡链球菌 DSM 15349	猪链球菌 ATCC 43765
DSM 32314	5.7	16.1	18.0
DSM 17299	0.0	0.0	5.5

[0195] 数据显示,DSM 32314能非常有效地抑制盲肠肠球菌、鸡链球菌和猪链球菌,特别是当与DSM 17299相比较时。

[0196] 参考文献:

[0197] MJ Kense,WJM Landman(2011).Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring:molecular epidemiology.Avian Pathology Vol.40, Iss.6.

[0198] 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.

[0199] 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.

[0200] PCT

0-1	PCT/RO/134 表 关于保藏微生物或其他生物材料 的说明 (PCT 细则 13 之二)	
0-1-1	使用如右栏程序制备	PCT Online Filing 版本 3.5.000.251e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	PCT/EP2017/062495
0-3	申请人或代理人文档号	2015P00370WO

[0201]

1	如下说明涉及的保藏微生物或其他生物材料见说明书	
1-1	页	1
1-2	行	17-22
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	DSMZ 莱布尼茨研究所 DSMZ-德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ)
1-3-2	保藏单位地址	因霍芬街 7B, 38124 德国不伦瑞克
1-3-3	保藏日期	2016 年 5 月 12 日
1-3-4	保藏编号	DSMZ 32314
1-5	本说明是为下列指定国作的	所有指定国
2	如下说明涉及的保藏微生物或其他生物材料见说明书	
2-1	页	10
2-2	行	24-26
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	DSMZ 莱布尼茨研究所 DSMZ-德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ)
2-3-2	保藏单位地址	因霍芬街 7B, 38124 德国不伦瑞克
2-3-3	保藏日期	2016 年 5 月 12 日
2-3-4	保藏编号	DSMZ 32315
2-5	本说明是为下列指定国作的	所有指定国
仅由受理局填写		
0-4	本页已经和国际申请一起收到 (是或否)	是
0-4-1	授权官员	Wilson Patrick
仅由国际局填写		
0-5	国际局收到本页日期	

[0202]	0-5-1	受权官员	
--------	-------	------	--

序列表

<110> 赢创德固赛有限公司

<120> 具有益生菌活性的地衣芽胞杆菌菌株

<130> 201500370

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1538

<212> DNA

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 1

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60
ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtya gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa 120
cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccgat gcttgattga 180
accgcatggg 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
tgacgggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta 540
gggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggg ttcttaagtc 600
tgatgtgaaa gccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggga acttgagtgc 660
agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaaacac 720
cagtggcgaa ggcgactctc tggctgttaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc 780
gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg 840
gtttccgccc tttagtgtg cagcaaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggtcg 900
caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa gcggtggagc atgtggttta 960
attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata 1020
gggcttcccc ttcgggggca gactgacagg tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt 1080
gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc cagcattcag 1140
ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat 1200
catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tgggcagAAC aaagggcagc 1260
gaagccgcga ggctaagcca atcccacaaa tctgtttctc gttecgatcg cagtctgcaa 1320
ctcgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc ggtgaatacg 1380
ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg 1440
tgaggtaacc ttttgagacc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaagtcgta 1500
acaaggtagc cgtatcggaa ggtgcggctg gatcacct 1538

```

<210> 2

<211> 1197

<212> DNA

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 2

```

gtgaagaata aatggctttc ttttttttca ggaaagatcc agcttgagat aacgggaaag 60
gggatcgagc gattattaaa tgaatgcacc aggcgcagca tcccgatgtt taatgttaag 120
aaaaagaaaag acgctgtctt tctttatatt ccgctttctg atgtacatgc cttccggagg 180
gtcataaggg attttgactg caagtgccgc ttcgtcagac gaaaagggtt ccctttcctt 240
gtgcagaagt ctaaacggaa tagcggcttc actattggaa ttgctgcttt ttttatcatc 300
atgttttttat tgtccaacat gctctggaaa attgacataa caggagccaa tccggagaca 360
gaacatcaaaa tcagacagca cttgaatcaa atcggcgctc aaaaagggcg ctttcagttt 420
acgatgctga ccccgaaaaa aattcagcag gcgcttaca agcgcgtcga aaacatcacc 480
tgggtgggca ttgaattaaa cggcacggcc cttcacatga aagtggttga aaaaaatgaa 540
cctgacaaaag aaaaaatat tgggtccgagg cacatcgctc ccaaaaaagg ggcgaccatc 600
tcgaaaatgt tcgtggaaaa aggcgagccg ctgcgcaccg tgaatcagca cgttgaaaaa 660
gggcaaatgc ttgtttccgg actgatcggg agcgaagagg aaaagcaaaa agtcggagcc 720
aaagggaaaaa tctacggtga aacctggtac aagtcaaagg taacggttcc tcttgagaca 780
tcatttgacg tttttacggg taaagtaagg acaagtcaca agctatcctt cggttctttt 840
tctgtgcctg tctggggcctt ttcttttaaa aaagaagagt tctcgcgtcc gaagacagaa 900
accgaaaaac actcgtgca ttttatgaat ttacgcttc ctgtcgcgta tgaaaaggaa 960
catacgagag agagcgaaca aatcaaaagg gtgtactcga aaaaagaagc ggtccttgaa 1020
ggggtcgaaa tgggaaaaag agacatcagg aaaaaaatcg ggagcgacgg gaacattatt 1080
agtgaaaaag ttttgcacga aacgagtga aatggtaaag ttaaattgat catcctttac 1140
caggttattg aagacattgt tcaaacaaca ccaattgttc aggagactaa agaatga 1197

```

<210> 3

<211> 1920

<212> DNA

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 3

```

gtggcaatgg aacagcaaaa taattacgat gaaaatcaga tacaggttct agagggttg 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 cgtcccgtg tagaagtcac catgacagtc 300
ctgcacgccg gaggaagtt tgacggaagc ggatataaag tttcaggcgg tttgcacggc 360
gtcggtgcat ctgttgtaa cgccctttca accgagctcg atgtaacggt ttacagagat 420
ggaaaagtcc attaccagga atttgaacgg ggcgttccga aagctgattt gaaagtcac 480
ggagatacgg aagtgcaggg aacgaccact cacttcaagc ctgatccgga aatattcac 540
gaaacgacgg aatacgacta tgatacgtt gccactcgtg tccgggagct cgctttcttg 600

```

acaaaaggcg tcaaaatcac gattgaagac aagcgagaag gaaaagaacg caagaatgat 660
 tactgctatg aaggcggat taaaagctat gttgaacact tgaaccgttc acgggaagtg 720
 gttcatgaag agccagtcta tattgaagga tccaaagacg gcattacggg cgaggtggct 780
 cttcaataca acgacagtta taccagcaac atttattcgt ttgccaataa cattcatacg 840
 tatgaaggcg gaacgcatga agccggcttt aagaccgggt tgacgagagt catcaatgat 900
 tacgcgagaa ggaacgggtg cttcaaagaa agcgatccga acttaagcgg ggaagacgtc 960
 cgtgaagggt tgacagcgat catttcaatc aagcatccgg atcctcaatt tgaaggcgag 1020
 acgaaaacaa agcttggcaa ctcaagaagc 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 cttttgcct ttgagaggga aaatcttgaa cgtcgaaaaa 1380
 gcacgcctgg acaaaatttt gtccaacaat gaggttcgtt ctatgatcac cgcgcttggc 1440
 accgggatcg gggaagattt caatcttgaa aaagcccgt accacaaagt cgtgattatg 1500
 acggatgccg acgtcgacgg tgcccacatc cgaacgttg tgctgacctt tttctaccgc 1560
 tacatgagac agatcatcga acaaggatat gtctacatcg ctcagccgcc gctttacaaa 1620
 atacagcagg ggaaacgcgt tgagtatgcg tacaatgacc agcagctcga agaaattcta 1680
 aaagagcttc cgcaaaatcc gaagccaggc ctgcagcgt 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> *Bacillus licheniformis*

<400> 4

ttgacaggtc aactagttca gtatggacga caccgccagc gcagaagcta tgcacgcatt 60
 agcgaagtgt tagaattacc aaatctcatt gaaattcaaa cctcttctta tcagtgggtt 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 cttttattat caacggtgcg gaacgggtca ttgtatctca gctcgttcgt 420
 tctccaagtg tataatttag tggtaaagta gacaaaaacg gtaagaaagg ttttaccgcg 480
 actgtcattc caaaccgtgg cgcgatgtta gaatacgaga ctgatgcgaa agatgttggt 540
 tatgtacgca tcgatcgac acgtaagttg ccggttacgg ttcttttgcg tgctcttggc 600
 ttcgatctg accaagagat cattgatctc atcggtgaaa acgagtattt gcgcaatacg 660
 cttgataaag ataatacgga aaacaccgat aaagcgcttc ttgaaatcta cgagcgtctt 720

cgtccaggag agccgcctac agtagaaaac gcaaaaagcc tgcttgattc aaggttcttt 780
 gatccgaaaa gatatgacct tgcaagtgtg ggacgttata aaattaataa aaagcttcac 840
 atcaaaaaaca gactgtttta tcagcggcctt gctgaaacgc tgatcgatcc tgaaacaggc 900
 gaaattcttg ccgaaaaagg cgcgatttta gacagaagaa cgcttgacaa agtcctgcct 960
 taccttgaaa acggaatcgg ttttaaaaag ctgtatccga acggcggagt tgttgaagat 1020
 gaagtgcgcg ttcagtctat taaaatctat gccccgacag atcaagaagg ggagcagaca 1080
 atcaatgtga ttggaaatgc ttatatgtga gaaggcgta 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 tcategcate aatcaaagag 1380
 tttttcggaa gctcgcagct ttctcagttt atggatcaga cgaatccgct tgctgagctg 1440
 acgcataagc gccgtctgtc agcgtcggga ccgggcggtt tgaccctga gcgcgccgga 1500
 atggaagtcc gtgacgttca ctattccac tacggccgga tgtgtccgat tgaaactcct 1560
 gagggccaac acatcggctt gatcaactcg ctttcttcat tcgcgaaagt gaaccgtttc 1620
 ggcttcatcg aaacgccgta tcgccgcgtt gaccctgaga ctggaaaagt aacgccgaga 1680
 atcgattact tgacagctga tgaagaagac aactatgtcg ttgccaggc taacgcacgt 1740
 ctgaatgatg acggatcttt tgtggatgac agcatcgtcg cccgtttcag aggggagaaac 1800
 accgttggtc cgaaagaccg cgtcgactat atggacgttt cgcctaaaca ggttgtctct 1860
 gccgcgactg catgtattcc tttcttgga aacgacgact caaacgcgc cctaattgga 1920
 gcgaacatgc aacggcaggc tgtacctt atgcagcctg aatctccgat cgtcggaaacc 1980
 ggaatggagt atgtatctgc aaaagactcc ggtgccgctg ttatttgccg ccatcctgga 2040
 atcgttgaac ggggtggaagc gaaaaacatc tgggtgcgcc gctatgaaga agtcgacggc 2100
 cagaaagtca aaggaaacct tgataaatac agcctgctga agtttgttcg ttccaaccag 2160
 ggaacttgct acaaccagcg tccgatcgta agcgtcgggt atgaggttgt aaaaggtgaa 2220
 atttttagctg acggtccgtc tatggaaaaa ggtgagcttg cccttgacg caacgtcatg 2280
 gtcggcttta tgacatggga tggctacaac tacgaggatg ccatcatcat gagcgaacgc 2340
 cttgtaaaaag acgacgtata cacgtctatt catattgagg aatacgaatc agaggcccg 2400
 gatacaaaac tcggacctga agaaattaca cgcgatattc caaacgtcgg tgaagacgct 2460
 cttcgcaatc tcgatgaacg cggaattatc cgtgtcgggt ctgaagtaaa agacggagat 2520
 cttcttggtg gtaaaagtaac gcctaaagggt gttacagagc ttactgcaga agagcgcctg 2580
 cttcacgcca tcttcggcga aaaagcgcgt gaagtcccg atacgtcgt gcgtgtgcc 2640
 cacggaggcg gcggtatcat cttgatgtg aaagtgttca accgcgaaga cggagacgaa 2700
 ctgcctccgg gcgttaacca gctcgtccgc gtttacatcg ttcagaaacg taaaatttct 2760
 gaaggggaca aaatggccgg acgccacggg aacaaagggt ttatttcgaa aatccttccg 2820
 gaggaagata tgccgtatct gcctgacgga acaccgattg acatcatgtt aaaccgctg 2880
 ggcgtaccat cgcgtatgaa catcgggcag gtgttgagc tgcaccttg tatggctgca 2940
 cgccgtctcg gtctgcatgt cgcgtcgccg gtatttgac gtgcccgcga agaagatgtg 3000
 tgggaaacgc ttgaagaagc cggcatgtca aggacgcaa 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 tgtaaatacg 3300
 gatgatgtcg taggccgtgt gaaaacatac gaagccatcg taaaaggcga caatgttcca 3360
 gaacctgggtg ttccggaatc gttcaaagta ttgatcaaag agcttcaaag cttaggtatg 3420
 gacgtcaaaa tcctatcaag cgacgaagaa gaaatcgaaa tgagagactt ggaagacgac 3480
 gaagacgcga aacaaaacga agggctttct ctgccgaatg atgaagagtc cgaagaattc 3540
 gttttctgctg acgcagagcg cgatgtcgtc acaaaagaat aa 3582

<210> 5

<211> 1635

<212> DNA

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 5

atggcaaaag atattaagtt tagcgaagaa gcccgcggtt caatgctgcg cgggtgtagat 60
 gcattggcgg atgctgtaaa ggtaactttg ggacctaaag gacgcaacgt cgttcttgag 120
 aaaaaattcg gttctccatt aatcacaaac gacggtgtta ccatcgcgaa agaaatcgaa 180
 cttgaagacg cgttcgaaaa catgggcgca aagcttggtg ctgaagttgc gagcaaaaca 240
 aacgatgttg ccggtgacgg tacaacaaca gcgacagttc tagctcaagc gatgattcgc 300
 gaaggtctta aaaacgtaac tgccggcgct aaccctgtag gcgtgcgcaa aggtatcgag 360
 caggctgtgg ctgtagcggg tgaaagcctg aaagaaatct ccaaaccaat cgaaggcaaa 420
 gaatcaatcg cacaagttgc ttcaatctcc gctgctgacg aagaagtcgg aagcctgac 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 agagcaaadc 1020
 gcggcacgcg tcaaccaaatt ccgcgtcaa gttgaagaaa caacttctga gttcgataaa 1080
 gaaaaattac aagagcgcct agctaagctt gcaggcggcg tagctgtcat caaagtcggc 1140
 gctgcgactg aaacagaatt gaaagaacgc aagcttcgca tcgaagacgc cctgaactct 1200
 actcgcgctg cggtagaaga aggaatcgta tcaggcgggt gtacagctct tgtcaatgtt 1260
 tacaataaag tagctgccct tgaagctgaa ggcgacgaac tgactggtat caacatcggt 1320
 cttcgcgctc ttgaagaacc aatccgtcaa atcgcgcaca atgcgggtct tgaaggatct 1380
 gtcacgtgtg agcgcctgaa aggcaagct 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
201500370 2