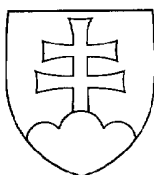


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

278 992

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 12N 1/20
A 23K 1/16
A 61K 35/76

- (21) Číslo prihlášky: 324-94
(22) Dátum podania: 09.09.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/763 175
(32) Dátum priority: 20.09.91
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 10.08.94
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 06.05.98
(86) Číslo PCT: PCT/US92/07589, 09.09.92

(73) Majiteľ patentu: Pioneer Hi-Bred International, INC., Des Moines, IA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Rutherford William M., Des Moines, IA, US;
Allen Jack E., Grimes, IA, US;
Dennis Scott M., Des Moines, IA, US;
Hinds Mark A., Minburn, IA, US;
Dana Gregory R., West Des Moines, IA, US;

(54) Názov vynálezu: **Probiotická zmes na podporu rastu hydiny**

(57) Anotácia:
Zmes je tvorená v podstate sušenými životaschopnými stabilnými mikrosférami *Enterococcus faecium* 301 ATCC 55059, na báze mastnej kyseliny a sušenými životaschopnými stabilnými mikrosférami *Enterococcus faecium* 202, ATCC 53519, na báze mastnej kyseliny.

Oblasť techniky

Vynález sa týka probiotickej zmesi, tvorenej mikrozapuzdrenými enterokokmi, na podporu rastu hydiny.

Doterajší stav techniky

U hydiny, predovšetkým u kurčiat a moriek, sa vo veľkej miere používajú prostriedky na podporu rastu vo forme antibiotík. Známymi antibiotikami sú napríklad prostriedky, ako je Stafac[®] a BMD[®] (bacitracínmetyléndisalicylát), ktoré sa používajú v subterapeutických množstvách, napríklad 10 a 25 g/t, ako prísady do krmív s cieľom podpory žiaducich rastových charakteristík hydiny. Používanie antibiotík na tieto účely je však v poslednom čase podrobované určitej kritike. Jedna z výhrad poukazuje na možnosť, že si hydina postupne vyvinie toleranciu proti antibiotikám a antibiotikum prestane pôsobiť pri podpore rastu. Ďalšie výhrady sa vzťahujú na zdravotné riziká prísady neprirodzených antibiotík a na znehodnocujúce účinky, ktoré môžu mať. Predsa len pre svoje výhody sú antibiotiká stále používané s cieľom zvýšenej konverzie krmiva, zlepšenia zloženia mäsa a posilňovania rastu.

Je známe, že určité baktérie môžu mať pri prídavku ku krmivám priaznivý účinok. Tento účinok spočíva v dodávaní prirodzenej črevnej mikroflóry. Niektoré spoločnosti ponúkajú na trhu probiotiká, ktoré obsahujú požadované baktérie. Tieto probiotiká však ťažko udržiavajú stabilný produkt. Najčastejšie sa probiotiká používajú v značne nízkom množstve, t. j. asi na úrovni prídavku 0,1 % ku krmivu. Nepoužitú krmivo alebo krmnu prísadu s obsahom probiotík však farmári často dlhodobo skladujú. Toto skladovanie sa uskutočňuje často v podmienkach, v ktorých sa vyskytuje určité množstvo vlhkosti a vysoká teplota. V mnohých prípadoch je množstvo vlhkosti práve dostatočné na aktiváciu začatia rastu baktérií, ale nedostatočné na jeho trvanie. V dôsledku toho baktérie zahynú a dôjde k strate účinnosti probiotiká. V iných prípadoch dochádza pri prídavku antibiotík ku krmivu alebo krmnej prísade, obsahujúcej probiotikum, k nepriaznivej interakcii s baktériami, predovšetkým ak je prítomné malé množstvo vlhkosti a opäť dochádza k uhynutiu baktérií. Dlhodobé skladovanie probiotík teda predstavuje významný problém.

V ďalšom prípade použitia, kde sa probiotiká pridávajú napríklad ku krmivám pre kurčatá, je obvyklé hmotu peletizovať a probiotikum pridávať pred peletizáciou. Vlhkosť z pary, používanej počas peletizácie, čiastočne aktivuje baktérie, ale môže viesť v dôsledku nedostatku vlhkosti k ich zničeniu. Zničiť ich môže tiež teplo počas peletizácie. Ďalej je tu problém potenciálnej dezaktivácie baktérií v kyslom prostredí žalúdka ešte predtým, ako sa reálne dostanú do čriev. Stále teda trvá potreba probiotík, ktoré by uvoľňovali mikroorganizmy až v čreve a nepodliehali predčasnému uvoľňovaniu vplyvom vlhkosti alebo nepriaznivých hodnôt pH, existujúcich v zažívacom trakte ešte pred tenkým črevom.

Pri chove hydiny je žiaduce dosahovať určité charakteristiky chovaných jedincov. Patrí medzi ne zvýšený hmotnostný prírastok, lepšia konverzia krmiva, zloženie mäsa a konečne jednotná veľkosť krídla. Zvýšený hmotnostný prírastok a lepšia konverzia krmiva sú samozrejme žiaduce pre úspory, ktoré sprevádzajú tieto výsledky. Ovplyvnenie kvality zloženia mäsa je dôležité preto, že najvhodnejšou uskladňovacou na ukladanie tkaniva s cieľom získania výberového mäsa je hrud'. Nie je teda dôležitý len hmotnostný prírastok, ale aj miesto, kde sa tento ukladá. Jednotná hmot-

nosť krídla je dôležitá preto, že ak má viac vtákov normálnu veľkosť, je potrebné menej ručnej práce a spracovateľ sa môže viac spoliehať na strojové spracovanie. Napriek tomu, pokiaľ sa vtáky značne líšia čo do veľkosti od veľmi malých až po veľmi veľké aj pri zachovaní celkovej hmotnosti krídla, vyžadujú menšie a väčšie vtáky oveľa viac ručnej práce a pre nejednotnú veľkosť nemôžu byť strojovo ľahko spracovávané. Jednotná veľkosť krídla s vysokým percentom distribúcie v rozmedzí normálnej veľkosti, umožňujúca spracovanie kurčiat normalizovaným zariadením, je teda žiaducou charakteristikou.

Podstata vynálezu

Prvoradým cieľom vynálezu je poskytnúť probiotikum pre hydinu, neobsahujúce antibiotiká a obsahujúce len prirodzene sa vyskytujúce mikroorganizmy mikrozapuzdrené masťnými kyselinami.

Probiotikum podľa vynálezu obsahuje dva kmene mikroorganizmov a to *Enterococcus faecium* 301, DSM 4789, a *Enterococcus faecium* 202, DSM 4788. DSM je skratka nemeckej zbierky bakteriálnych kultúr Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, umiestnenej v Braunschweigu, Nemecko. Tieto organizmy boli uložené v US zbierke mikroorganizmov ATCC pod číslom ATCC 55059 a ATCC 53519.

Toto probiotikum, poskytuje pri hydine zvýšený hmotnostný prírastok, lepšiu konverziu krmiva, vyšší výťažok hrudného mäsa a jednotnú hmotnosť krídla v rozmedzí normálnych veľkostí.

Ďalšou výhodou probiotika podľa vynálezu vhodného na dávkovacie krmnu prísadu pre hydinu je, že obsahuje baktérie, ktoré sú vo forme mikrosfér, pripravených s použitím špeciálnej rotačnej techniky pomocou matrice voľných masťných kyselín.

Probiotikum podľa vynálezu je stabilné počas 3 až 6 mesiacov bez významného zníženia počtu životaschopných mikroorganizmov. Spôsob rotačného formovania guľôčok zo sušených baktérií umožňuje dosiahnuť ich jednotnú veľkosť, guľôčky baktérií sušených na rotačných diskoch sú voľne sypké a ľahko zapracovateľné do krmných dávok pre hydinu.

Predmetom vynálezu je kompozícia na podporu rastu hydiny, spočívajúca v tom, že sa k bežnej krmnej dávke pre hydinu pridá malé, ale na podporu rastu účinné množstvo probiotika, ktoré obsahuje sušené mikrosféry *Enterococcus faecium* 301, DSM 4789, ATCC 55059, na báze masťných kyselín a sušené mikrosféry *Enterococcus faecium* 202, DSM 4788, ATCC 53519, na báze masťných kyselín, kde sú mikrosféry výhodne formované sušením na rotačných diskoch.

Bolo s prekvapením zistené, že podporu rastu hydiny je možné dosiahnuť tak, že sa k bežným krmným dávкам pre hydinu pridáva určité množstvo mikrosfér *Enterococcus faecium* 301, DSM 4789, ATCC 55059, na báze masťných kyselín a určité množstvo mikrosfér *Enterococcus faecium* 202, DSM 4788, ATCC 53519, na báze masťných kyselín. Použitou masťnou kyselinou môže byť ktorákoľvek z voľných masťných kyselín C₁₂ až C₂₄, výhodne kyselina stearová. Mikroorganizmy sú výhodne prítomné v približne rovnakom množstve, ale ich zastúpenie sa môže pohybovať od asi 30 do asi 70 % jedného z organizmov, pričom zvyšok tvorí druhý mikroorganizmus.

Nie je presne známe, prečo tieto dva mikroorganizmy zabezpečujú dosiahnutie žiaducich charakteristík, predovšet-

kým zvýšený hmotnostný prírastok, lepšiu konverziu krmiva, zvýšený výťažok hrudného mäsa a zvýšenú jednotnosť hmotnosti krdla. Skutočnosťou je, že sa tak deje, pokiaľ sú oba prítomné v takej kombinácii, aby mohli navzájom nejakým interagovať, a za predpokladu, že ich množstvo je v uvedenom rozmedzí. Práve určitou interakciou a vzájomným pôsobením uvedených faktorov sa dosahujú žiaduce charakteristiky, ktoré umožňujú významne zlepšiť zloženie, kvalitu a spracovanie mäsa hydiny.

Množstvo probiotika, pridávaného ku kŕmnej dávke, sa môže značne meniť, ale obvykle by malo byť v rozmedzí asi 0,227 kg až asi 0,907 kg (t. j. 0,5 až asi 2,0 libry) na tonu krmiva, obvykle asi 0,363 kg až asi 0,544 kg (t. j. asi 0,8 až asi 1,2 libry) na tonu krmiva a najčastejšie asi 0,4536 kg (t. j. asi 1 libra) na tonu krmiva. Počet mikroorganizmov, t. j. počet jednotiek tvoriacich kolóniu na gram (CFU/g), prítomný v probiotiku, sa môže taktiež pohybovať v rozmedzí asi $1 \cdot 10^6$ až asi $2 \cdot 10^9$ CFU/g a výhodne asi $2 \cdot 10^8$ CFU/g.

Ak sa správa sa kombinácia uvedených dvoch kmeňov ako promótor rastu. Doteraz používané rastové promótory zahŕňajú antibiotiká, ako je Stafac^R a BMD. Výhody subterapeutického množstva antibiotík ako rast podporujúcich prísad, je možné dosiahnuť pomocou prirodzene sa vyskytujúcich mikroorganizmov podľa vynálezu, pokiaľ sa probiotikum vyrába v súlade s vynálezom a pridáva sa ku krmivu spôsobom podľa vynálezu. Boli ďalej vykonané určité pokusy, poukazujúce na to, že spoločná kombinácia probiotika a rastového promótoru presahuje svojimi výhodami každú z jednotlivých zložiek, a preto je možné ju používať spoločne, ak je to žiaduce. Vo väčšine prípadov je však výhodné používať probiotikum samotné, pretože jedným z účelov vynálezu je eliminovať používanie rastových promótorov vôbec.

Spôsob spracovania mikroorganizmov nie je rozhodujúci, pokiaľ je možné mikroorganizmy udržať nažive až po ich dodanie zvieratám a uviesť ich do takej formy, že sa dobre spoja s krmivom a majú všeobecne jednotnú veľkosť, aby bolo možné kontrolovať dávkovanie.

Výhodným prostriedkom na splnenie týchto požiadaviek je spracovanie mikroorganizmov do mikrosfér pomocou matrice z masťnej kyseliny. Tento postup je opísaný v základnej prihláške spolupôvodcu Rutherforda et al. Pri tomto postupe sa baktérie kombinujú so zahriatou masťnou kyselinou. Teplota masťnej kyseliny a čas vystavenia baktérii pôsobeniu masťnej kyseliny sa reguluje tak, aby sa baktérie udržali nažive, ale aby bolo možné ich s masťnou kyselinou premiešať. Zmes sa umiestni na rotujúci disk za vzniku mikrosfér s obsahom baktérií, kde masťná kyselina pôsobí ako matrica. Použitím tejto metódy sa dosahuje niekoľko významných výhod. Po prvé sa baktérie počas spracovania udržia nažive; po druhé proces v kombinácii s technikou rotačného disku umožňuje získať jednotne veľké mikrosféry pre lepšie dávkovanie. Po tretie umožňuje charakter matrice, t. j. masťné kyseliny, tvorbu jedinečných mikrosfér. Kombinácia týchto faktorov vedie s maximálnou efektívnosťou k vysoko stabilnému probiotiku.

V procese podľa základnej prihlášky je dôležité si povšimnúť, že vznikajú mikrosféry, kde každú guľôčku tvorí množstvo baktérií v matrici z voľnej masťnej kyseliny skôr, ako by bola každá jednotlivá baktéria zapuzdrená v povlaku alebo filmu podobnej vrstve masťnej kyseliny. To prináša výhody stability a účinnejšieho dávkovania pri spracovaní baktérií.

Výhodným zapuzdrovacím prostriedkom je voľná masťná kyselina C₁₂ až C₂₄. Je možné používať aj zmes masťných kyselín, ale výhodné je používať jednotlivú čistú masťnú kyselinu. Je rovnako výhodné, ak je voľnou mas-

tnou kyselinou nenasýtená masťná kyselina; najvýhodnejšia je kyselina stearová.

Všeobecne je dôležité, aby masťná kyselina mala teplotu topenia nižšiu ako 75 °C, výhodne v rozmedzí 40 až 75 °C. Aby mohla účinne pôsobiť ako matrica, musí byť samozrejme tuhá pri teplote miestnosti. Týmto požiadavkám vyhovujú všetky voľné masťné kyseliny v medziach doteraz uvedenej chemickej definície.

S cieľom zvýšenia stability produktu sa baktérie do produktu obvykle pridávajú v lyofilizovanej forme. Potom je možné ich oživiť prídavkom vlhkosti.

Mikrosféry, vyrobené ďalej opísaným spôsobom, sú obvykle z asi 50 až viac ako 90 % hmotnostných tvorené zložkou masťnej kyseliny a zvyšok je bakteriálna kultúra. Výhodné rozmedzie je asi 60 až asi 75 % masťnej kyseliny. Ak je použité príliš málo masťnej kyseliny, nie je matrica vhodná na ochranu. Oproti tomu, pri použití prílišného množstva, je matrica príliš silná a neumožňuje adekvátne uvoľňovanie v čreve.

V spôsobe výroby probiotika podľa vynálezu sa používa na vytváranie mikrosfér rotačný disk. Technológia rotačného disku spočíva všeobecne v tom, že sa suspenzia baktérií a masťnej kyseliny dokonale premieša a zmes sa rovnakou rýchlosťou privádza na stred rotujúceho disku z nehrdzavejúcej ocele. Vplyvom odstredivej sily je zmes vrhaná smerom von a tvorí mikrosféry. Tie sa potom zbierajú v chladiacej komore, udržovanej na podmienkach okolia alebo mierne nižších, triedia a pripravujú sa na balenie. Zatiaľ čo zapuzdrowanie na rotačných diskoch je známe, nie je známe vyrábať mikrosféry, obsiahnuté v matrici bez obklopujúceho puzdra, ani nie je známe použitie výroby mikrosfér alebo zapuzdrowania lyofilizovaných baktérií. O zapuzdrowaní s použitím rotačného disku všeobecne pojednáva Johnson et al. zo Southwest Research Institute of San Antonio v Journal of Gas Chromatography, október 1965, str. 345-347. Zapuzdrowanie pomocou rotačného disku, vhodné na použitie podľa vynálezu, je ďalej podrobne opísané v patente US 4 675 140, udelenom Sparksovi 23.6.1987 s názvom "Spôsob obaľovania častíc pre kvapky kvapaliny". Najvýhodnejší je však postup, opísaný v základnej prihláške.

Je potrebné zdôrazniť, že rotačná tvorba mikrosfér poskytuje zreteľne odlišný produkt, tak bežné rozprašovanie sušenie, ako aj mikrozapuzdrowanie. Pri bežnom rozprašovaní sušení vo veži existuje tendencia k nakopeniu častíc a vzniku nepravidelného povlaku, čo významne ovplyvňuje stabilitu produktu, a znižuje ju na úroveň dní až týždňov. Mikrozapuzdrowaním vzniká okolo objektu obal a ukázalo sa, že baktérie sú potom príliš malé, príliš ťažko sa udržujú pri živote alebo získavajú v jednotnej veľkosti, aby boli prakticky použiteľné. Pri výrobe mikrosfér, predovšetkým s použitím prostriedkov opísaných v tomto vynáleze, sa dosahuje stabilita získaných baktérií, a to aj pri vystavení pôsobeniu vlhkosti a antibiotík, počas troch až šiestich mesiacov a životnosť baktérií v časticiach s rovnomernou distribúciou zostáva zachovaná.

Ak sa používajú mikrosféry na báze voľných masťných kyselín podľa vynálezu v uvedených rozmedziach, môže rotačný disk, najčastejšie s rozmerom 10, 16 až 15,24 cm (4 až 6 palcov), rotovať rýchlosťou 2 000 až 4 000 min⁻¹, výhodne asi 2 500 až 3 200 min⁻¹, a rýchlosť podávania môže byť 50 až 200 g/min. Výhodné podmienky podľa súčasných znalostí zahŕňajú použitie kyseliny stearovej, použitie dvoch uvedených organizmov, štvorpalcový rotačný disk, 3 000 min⁻¹ a rýchlosť podávania suspenzie baktérií, obsahujúcej 35 % baktérií a 65 % kyseliny stearovej, 100 g/min.

Pri týchto podmienkach sa získa produkt s veľkosťou častíc 75 až 300 µm s výhodnou veľkosťou pod 250 µm.

Prehľad obrázkov na výkresoch

- Vynález je vysvetlený na pripojených výkresoch, kde:
- na obr. 1, 2 a 3 je graficky znázornená stabilita kmeňov mikroorganizmov s použitím matrice kyseliny stearovej,
 - na obr. 4 je graf, znázorňujúci distribúciu hrudného mäsa pri kŕmnych pokusoch s probiotickou kompozíciou podľa vynálezu,
 - na obr. 5 je graf, znázorňujúci distribúciu telesnej hmotnosti pri kŕmnych pokusoch s probiotickou kompozíciou podľa vynálezu a
 - na obr. 4 a 5 je znázornený kontrolný pokus, pokus s použitím antibiotika a pokus s použitím probiotiká podľa vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Na bližšie objasnenie, ale nie obmedzenie, uskutočnenia vynálezu, sú uvedené príklady. Príklady sú opísané v súvislosti s obrázkami 1, 2 a 3 na pripojených výkresoch. Príklady 1 až 4 a obr. 1, 2 a 3 sa vzťahujú k skoršiemu vynálezu rovnakého pôvodu. Príklad 5 a tabuľky 2 až 10 sa vzťahujú k probiotiku podľa tohto vynálezu.

Príklad 1

Príklad 1 koreluje s obr. 1. Vysvetľuje stabilitu produktu pri použití dvoch rôznych kmeňov *Enterococcus faecium* pri teplotách 4 a 27 °C. Na obr. 1 je znázornená stabilita zapuzdrených kmeňov *Enterococcus faecium* po zapuzdrení pomocou zariadenia s rotujúcim diskom s použitím kyseliny stearovej a pri hmotnosti kultúry 35 %. Tvorba mikrosfér prebieha pri uvedených podmienkach, t. j. suspenzia baktérií v kyseline stearovej 35/65 pri teplote 60 °C s použitím štvorpalcového rotačného disku s rýchlosťou otáčania 3 000 min⁻¹ a rýchlosťou podávania 100 g/min. Gulôčky boli vytvorené, vložené do teplom zatavených vreciek s parnou bariérou a týždenne boli deštruktívne odoberané vzorky na stanovenie CFU. Je zrejmé, že produkt podľa vynálezu si udržal vynikajúce počty jednotiek tvoriacich kolónie mikroorganizmov (CFU) počas času skladovania dosahujúcej až 70 dní.

Príklad 2

Príklad 2 je nutné interpretovať v spojení s obr. 2. Obrázok znázorňuje stabilitu jednotlivých kmeňov vo forme mikrosfér po primiešaní k obvyklej kŕmnej dávke v prítomnosti troch hydinových antibiotík. Kŕmna dávka mala zloženie:

jemne drvená kukurica	54	%
sójová múka	26	%
rybacia múčka	2	%
fosforečnan divápenatý	1,5	%
vápenec	1	%
sójový olej	5,5	%
obsah vlhkosti	12	%

Boli pridané tri antibiotiká v tomto množstve: dekokinoát 6 % (454 ppm), salinomycín (50 ppm) a sodná soľ monenzínu (120 ppm).

K zmesi bola pridaná kultúra v množstve, poskytujúcom približne 1.10⁶ CFU/g krmiva.

Krmivo bolo balené do teplom zatavených vreciek a inkubované pri teplote miestnosti. Týždenne boli odoberané vzorky na stanovenie CFU. Graf na obr. 2 ukazuje výbornú stabilitu.

Príklad 3 je potrebné interpretovať v spojení s obr. 3. Vysvetľuje stabilitu mikrosfér *Enterococcus faecium* v kŕmive v prítomnosti rôznych antibiotík. Kŕmna dávka bola tvorená 60 % jemne drvenej kukurice, 38 % sójovej múky a 2 % vápenca s obsahom vlhkosti asi 14 %. Bola pridaná kultúra do hodnoty približne 10⁶ CFU/g krmiva a zmes bola premiešaná. Librové alikvotné diely, t. j. vo váhe 0,4536 kg boli skladované v zatavených vreckách pri 20 °C a týždenne počas 16 týždňov boli odoberané vzorky. Do kŕmnej dávky boli zahrnuté antibiotiká v tomto množstve:

Príklad 3

metyléndisalicylát bacitracínu 50 g/t
carbadox 50 g/t
chlórtetracyklín 200 g/t
lasalocid 30 g/t
linkomycín 100 g/t
neomycín 140 g/t
oxytetracyklín 50 g/t
sulfametazín 100 g/t
tylozín 100 g/t
virginiamycín 20 g/t
A5P250 100 g/t
furadox 10 g/t.

metyléndisalicylát bacitracínu	50 g/t
carbadox	50 g/t
chlórtetracyklín	200 g/t
lasalocid	30 g/t
linkomycín	100 g/t
neomycín	140 g/t
oxytetracyklín	50 g/t
sulfametazín	100 g/t
tylozín	100 g/t
virginiamycín	20 g/t
A5P250	100 g/t
furadox	10 g/t

V tabuľke 1 sú uvedené minimálne časy pre stratu 1 log jednotiek tvoriacich kolónie (CFU).

Tabuľka I

Čas v týždňoch pre stratu 1 log počtu CFU pri 20 °C v drvenom kŕmive so 14 % vlhkosťou

Antibiotikum	Čas skladovania (dni)
kontrola	103
bacitracín	88
carbadox	54
chlórtetracyklín	60
lasalocid	57
linkomycín	75
neomycín	53
oxytetracyklín	59
sulfametazín	62
tylozín	52
virginiamycín	112
ASP250	67
furadox	53

Príklad 4

V príklade 4 bola stanovovaná stabilita produktu po peletizácii na použitie v kŕmive pre kurčatá. Mikrosféry boli vytvorené za uvedených podmienok. V tomto pokuse boli ďalej použité tieto podmienky:

- surový proteín, nie menej ako 18,0 %
- surový tuk, nie menej ako 5,0 %
- surová vláknina, nie viac ako 6,0 %

S ďalej uvedenými prísadami a podmienkami boli vyrobené pelety s antibiotikom (CTC 50 g/t) a bez neho obsahujúce: kukuricu, SBM, srvátku, sójový olej, fosforečnan divápenatý, vápenec, stopový minerálny premix, vitamínový premix, selén, síran meďnatý. Kultúra bola pridaná v množstve približne 5.10⁵ CFU/g krmiva. Teplota kondicionácie bola 70 °C a pelety za dýzou mali 78 °C. Pelety boli skladované v nezatavených vreckách a týždenne boli odoberané vzorky na stanovenie CFU. V žiadnom z prípadov nebola podmienkami peletizácie nepriaznivo ovplyvnená

stabilita produktu. Peletizovaný produkt mal konkrétne stabilitu rovnakú ako nepeletizovaný produkt.

Příklad 5

4 560 jednodenných kuracích brojlerov Peterson x Arbor Acres bolo náhodne rozdelených do podlahových kŕmnikov (tabuľka 2) s upravovanou podstielkou a kŕmených 45 dní. Všetky vtáky, uhynuté počas prvých 5 dní, boli nahradené vtákmi rovnakého pohlavia z tej istej dodávky a rovnako ošetrovanými. Zloženie základných výživových iniciálnych, rastových a útlmových dávok je uvedené v tabuľke 3. Tieto kŕmne dávky boli upravované tak, aby obsahovali 1425 (iniciačná), 1450 (rastová) a 1475 (útlmová) kcal ME/lb, t. j. na 0,4536 kg spolu s 90 g/t monezínu. Iniciačná dávka bola podávaná od 1. do 21. dňa veku, rastová od 21. do 42. dňa veku a útlmová od 42. do 49. dňa veku. Ako jednotlivé pokusy boli hodnotené: drvená negatívna kontrola (kontrola M); vybrané zapuzdrené probiotické kultúry obsahujúce *Enterococcus faecium* 301, DSM 4789, t. j. ATCC 55059 a *Enterococcus faecium* 202, DSM 4788, t. j. ATCC 53519, zapuzdrené masťou kyselinou pomocou rotačného disku podľa príkladu 1 a prítomné jednotlivo v množstve 50 % probiotika, dodávaného k drvenému krmivu v dávke 1.10^5 CFU/g krmiva (probiotikum M); peletizovaná negatívna kontrola (kontrola P); probiotikum v množstve 1.10^6 CFU/g drveného krmiva, peletizované (probiotikum P) a pozitívna kontrola s obsahom 10 g/t virginiamycínu, peletizovaná (Stafac^R 10). Iniciačná dávka bola v pokusoch, kde bola vykonaná peletizácia, rozdobená.

Na každú pokusnú dávku bolo použitých zdvojených dvanásť kŕmnikov s 35 kohútikmi a 35 sliepočkami. Na každý kŕmnik bola zaznamenávaná telesná hmotnosť, spotreba krmiva a úmrtnosť po prvých 5 dňoch. Na každý kŕmnik bola vypočítaná konverzia krmiva, upravená konverzia krmiva a konverzia krmiva upravená na telesnú hmotnosť.

Všetky údaje boli podrobené rozptylovej analýze a rozdiely boli stanovené pomocou Fisherovho LSD.

Pred pokusom bol koncentrát probiotickej kultúry nadstavený uhlíčanom vápenatým. Teoretické počty boli u probiotika M rovné 1.10^8 CFU/g produktu a u probiotika P 2.10^9 CFU/g produktu. Na stanovenie skutočného počtu bola pri každom produkte meraná duplicitne vzorka 11 g. Každá vzorka bola spracovaná na platniach štandardnou metódou Pioneer pre baktérie zapuzdrené kyselinou mliečnou. Na každú výrobnú fázu bola vykonaná skúška premiešania. Skúška bola určená na zaistenie rovnomernej distribúcie probiotika v príslušnom zastúpení v krmive a zachovanie jeho životnosti počas peletizácie. Z každej šarže boli odoberané vzorky v čase vrecovania; pri drvených produktoch 4 rovnomerne rozmiestnené vzorky a pri peletizovaných produktoch 10 rovnomerne rozmiestnených vzoriek (t. j. vrecká 1, 3, 5, ..., 35, 37 a 39).

Počas 1. a 4. týždňa pokusu boli odoberaté vzorky nekontaminovaného krmiva zo striedavo umiestnených kŕmnikov; zo zostávajúcich kŕmnikov boli odoberaté vzorky v 2. a 6. týždni kŕmneho pokusu.

Rovnaký počet vtákov oboch pohlaví bol usmrtený na stanovenie hmotnosti mäsa z hrude, telesnej hmotnosti a dĺžky tenkého čreva. U každého vtáka bol vypočítaný výťažok hrudného mäsa a pomer hmotnosti a dĺžky čreva.

Všetky údaje boli podrobené rozptylovej analýze a rozdiel bol stanovený pomocou kontrastu a odhadovaných

hodnôt požadovaných účinkov.

Šesťdesiat vtákov z každého pokusu bolo dopravených na univerzitu na senzorické chuťové hodnotenie.

Probiotikum bez ohľadu na spracovanie zlepšovalo ($P < 0,05$) konverziu krmiva oproti príslušnej kontrole, zatiaľ čo hmotnostný prírastok zvyšovalo ($P < 0,05$) oproti kontrole len u drveného krmiva (tabuľka 4). Probiotikum P zlepšovalo ($P > 0,05$) konverziu krmiva oproti Stafacu^R 10, ktorý mal podobnú hodnotu ($P > 0,05$) ako kontrola P.

Produkt mal požadované zloženie, pokiaľ ide o zastúpenie a kmeň (tabuľka 5).

Probiotikum bolo v krmive rovnomerne distribuované. Probiotikum M malo požadované zastúpenie, zatiaľ čo probiotikum P bolo v množstve o 1 až 1-1/2 log vyššie ako sa požaduje pre iniciačnú a rastovú kŕmnu dávku (tabuľka 6). Vysoké počty u probiotika P boli dôsledkom predimenzovania produktu na zaistenie dostatočného výťažku mikroorganizmu po peletizácii.

V prípade probiotika P zodpovedali vzorky z podlahy kŕmnikov tesne počtom zo skúšky premiešania (tabuľka 7). Probiotikum M však v rastových a útlmových zmesiach vo 4. a 6. týždni pokleslo 0 2 log.

Probiotikum M zvýšilo ($P < 0,05$) oproti kontrole M tak ako výťažok hrudného mäsa (tabuľka 8), zatiaľ čo probiotikum P vykázalo zlepšenie ($P > 0,05$) oproti kontrole P. Zlepšenie u drveného krmiva súhlasí s výsledkami, zistenými v predchádzajúcom pokuse. Probiotikum P nevykázalo podobnú veľkosť zlepšenia výťažku hrudného mäsa, ako v prípade probiotika M. Toto zlyhanie môže byť dôsledkom lepšieho využitia energie peletizáciou, ktoré ponecháva menej priestoru na zlepšenie.

Použitím peletizovaného krmiva sa priemerná hmotnosť vtáka oproti drvenému krmivu zvýšila o 96 g. Probiotikum zvýšilo jednotnosť hmotnosti vtákov (obr. 5) s najväčším zlepšením u drveného krmiva.

Peletizáciou sa oproti drvenému krmivu zvýšila priemerná hmotnosť hrudného mäsa o 15 g. Probiotikum zvýšilo oproti kontrole priemernú hmotnosť hrudného mäsa a jednotnosť (obr. 4) s najväčším zlepšením u drveného krmiva. Stafac^R 10 vykázal najväčšie zlepšenie jednotnosti u peletizovaných krmív.

Peletizáciou sa oproti drvenému krmivu zvýšil výťažok hrudného mäsa o 0,53 percentuálnych jednotiek. Probiotikum M vykázalo zvýšenie o 0,84 percentuálnych jednotiek oproti kontrole M, pri ktorej už bola veľkosť podobná výsledku peletizácie.

Použitím probiotika sa dosiahla kratšia ($P > 0,05$) dĺžka tenkého čreva, ako pri oboch kontrolách a u Stafacu^R, vyjadrené skutočnou dĺžkou, pomerom telesnej hmotnosti aj hmotnosti hrudného mäsa (tabuľka 9). Pri použití probiotika M bola menšia ($P > 0,05$) hmotnosť tenkého čreva ako v kontrole M, vyjadrené buď ako skutočná hmotnosť alebo percento telesnej hmotnosti alebo hmotnosti hrudného mäsa. Zníženie hmotnosti a dĺžky čreva v prípade probiotika ukazuje na menšie množstvo energie nutnej na výživu a viacej energie k dispozícii pre rast, čo potvrdzuje zlepšená konverzia krmiva a výťažok hrudného mäsa (tabuľka 7 až 8).

Vtáky, ošetrované probiotikom P, nemali v porovnaní so Stafacom^R 10 cudzí pach (tabuľka 10). V druhom pokuse sa zistilo, že probiotikum P zlepšilo oproti kontrole P chuť stehenného mäsa. Toto zlepšenie však nebolo pozorované v prvom pokuse.

Tabuľka 2
Rozvrhnutie kŕmnikov

Ošetrovanie	Číslo kŕmnikov
kontrola P	2, 6, 15, 17, 22, 26, 104, 109, 113, 117, 122, 126
probiotikum P	4, 8, 12, 16, 21, 28, 105, 106, 112, 118, 125, 130
Stafac ^R	10, 5, 7, 11, 18, 23, 27, 101, 107, 111, 116, 123, 129
kontrola M	3, 9, 13, 20, 24, 30, 102, 108, 114, 119, 121, 127
probiotikum M	1, 10, 14, 19, 25, 29, 103, 110, 115, 120, 124, 128

Veľkosť kŕmníka 1,28 x 4,72 m (t. j. 4,2' x 15,5'), jedno rúrkové kŕmidlo, jedno zavesené napájadlo, borovicové hobliny ako podstielka, energetický a odparovací chladiaci systém, dobre izolované vykurovanie núteným obehom vzduchu, konštrukcie so závesovými priehradkami.

Tabuľka 3
Zloženie základných kŕmných dávok

Zložky	Produkčná fáza		
	iniciačná %	rastová %	útlmová (%)
mletá kukurica	65,37	67,89	74,29
sójová múčka	25,58	23,53	17,83
mäsovkostná múčka	3,00	3,00	3,00
tuk	3,36	3,32	2,59
defluórovaný fosfát	0,95	0,79	0,73
uhličitán vápenatý	0,61	0,62	0,63
soľ	0,35	0,31	0,32
stopové minerály	0,05	0,05	0,05
metionín	0,39	0,28	0,33
lyzín	0,19	0,06	0,18
vitamínový premix	0,05	0,05	0,05

Tabuľka 4
Produkčné údaje pre podlahové kŕmniky

	Peletizované			Drvené	
	Kontrola	P*	Stafac ^R 10	kontrola	M*
hmotnosť, kg	2,17 ^a	2,18 ^a	2,17 ^a	2,06 ^b	2,12 ^a
konverzia krmiva	1,871 ^b	1,827 ^a	1,855 ^{ab}	1,917 ^c	1,856 ^a
upravená konverzia krmiva ¹	1,832 ^b	1,789 ^a	1,807 ^{ab}	1,887 ^c	1,812 ^a
konverzia krmiva upravená na hmotnosť ²	1,801 ^b	1,755 ^a	1,775 ^{ab}	1,897 ^c	1,798 ^b
úmrtnosť, %	4,40	4,64	5,95	3,33	5,60

¹ upravená konverzia krmiva = celkové krmivo/(živá + mŕtva hmotnosť)

² konverzia krmiva upravená na hmotnosť = upravená konverzia krmiva - [(hmotnosť-4,60)/6]^{abc} P < 0,05

* podľa výnálezu

Tabuľka 5

Kontrola a zaistenie kvality produktu

Ošetrovanie	Pomer		
	QC ¹ počet CFU/g produktu	QA ² počet CFU/g produktu	kmeňov SF202 : SF301
probiotikum P	5,75.10 ⁸	1,01.10 ⁸	50 : 50
probiotikum M	9,54.10 ⁷	9,60.10 ⁷	57 : 43

¹ kontrola kvality
² zaistenie kvality

Tabuľka 6

Test premiešania krmiva a výťažok

Produkčná fáza a ošetrovanie	Drvené CFU/g krmiva	Peletované CFU/g krmiva	Výťažok ¹ % drven.
Iniciačná			
kontrola P	NA ²	1,06.10 ³	-
probiotikum P	2,02.10 ⁶	1,67.10 ⁶	98,69
Stafac ^R 10	NA	6,46.10 ³	-
kontrola M	2,51.10 ³		
probiotikum M	1,34.10 ⁵		
Rastová			
kontrola P	NA	4,86.10 ²	-
probiotikum P	3,89.10 ⁶	1,09.10 ⁶	91,62
Stafac ^R 10	5,25.10 ⁴	6,42.10	-
kontrola M	1,00.10 ²		
probiotikum M	1,48.10 ⁵		
Útlmová			
kontrola P	8,50.10 ²	1,11.10 ³	-
probiotikum P	7,04.10 ⁴	4,91.10 ⁵	117,40
Stafac ^R 10	8,80.10 ³	1,79.10 ⁴	-
kontrola M	8,92.10 ²		
probiotikum M	1,33.10 ⁵		
Priemer			
kontrola P	8,50.10 ²	8,28.10 ²	-
probiotikum P	8,21.10 ⁵	9,64.10 ⁶	118,09
Stafac ^R 10	2,15.10 ⁴	9,05.10 ³	
kontrola M	8,72.10 ²		
probiotikum M	1,38.10 ⁵		

¹ výťažok vypočítaný z údajov transformovaných do log₁₀

² NA = nie je k dispozícii

Tabuľka 7

Zaistenie kvality v podlahových kŕmnikoch

Ošetrovanie	Týždeň				
	1	2	4	6	priemer
	CFU/g krmiva				
kontrola	3,78.10 ²	3,83.10 ²	8,60.10 ²	2,21.10 ²	4,08.10 ²
probiotikum P	9,23.10 ⁵	9,37.10 ⁵	8,77.10 ⁵	8,48.10 ⁵	8,96.10 ⁵
Stafac ^R 10	8,73.10 ²	1,29.10 ²	6,46.10 ²	8,63.10 ²	8,89.10 ²
kontrola M	3,46.10 ²	1,26.10 ²	2,79.10 ³	2,00.10 ²	5,08.10 ²
probiotikum M	1,43.10 ⁵	1,25.10 ⁵	1,75.10 ³	1,00.10 ³	2,32.10 ⁴

Tabuľka 8

Hodnotenie výťažku hrudného mäsa

	Peletované			Drvené	
	Kontrola	P*	Stafac ^R 10	Kontrola	M*
telesná hmotnosť (g)	2 240,7	2 230,1	2 195,9	2 143,8	2 149,9
hmotnosť hrudného mäsa (g)	234,4 ^a	239,6 ^a	232,0 ^a	213,3 ^b	229,6 ^a
výťažok hrudného mäsa (% telesnej hmotnosti)	10,51 ^a	10,68 ^a	10,58 ^a	9,93 ^b	10,67

^{ab} P < 0,05

* podľa vynálezu

Tabuľka 9

Hmotnosť a dĺžka čreva

	Peletované			Drvené	
	Kontrola	P*	Stafac ^R 10	Kontrola	M*
TH (g)	2 240,7	2 230,1	2 195,9	2 143,8	2 149,9
HHM (g)	234,4a	239,6a	232,0a	213,3a	229,6a
HTČ (g)	92,6	93,3	93,4	91,4	87,4
DTČ (cm)	193,80	191,26	194,56	193,29	191,26
TČ (g/cm)	0,478	0,484	0,480	0,472	0,457
HTČ (g/100 g TH)	4,17	4,18	4,27	4,29	4,08
DTČ (cm/100 g TH)	8,81	8,64	8,97	9,17	8,97
HTČ (g/100 g HHM)	40,19	39,70	40,97	43,96	38,69
DTČ (cm/100 g HHM)	84,86a	81,97a	85,65a	93,70b	84,86

^{ab} P < 0,05

* podľa vynálezu

TH telesná hmotnosť

HHM hmotnosť hrudného mäsa

TČ tenké črevo

HTČ hmotnosť tenkého čreva

DTČ dĺžka tenkého čreva

Tabuľka 10

Chuťové panelové hodnotenie

Tkanivo	Porovnanie skupín	Počet správnych identifikácií		
		pokus 1	pokus 2	súčet
stehno	Stafac ^R 10 vs. Kontrola P	6	3	9
	Stafac ^R 10 vs. XINOC P	3	4	7
	probiotikum P vs. Kontrola P	2	8*	10
hrud'	Stafac ^R 10 vs. kontrola P	2	6	8
	Stafac ^R 10 vs. XINOC P	1	3	4
	probiotikum P vs. Kontrola P	5	4	9

* hodnotitelia boli schopní delegovať jednotlivú vzorku v štatisticky významnom (P < 0,05) počte prípadov

¹ počet správnych identifikácií jednotlivkej vzorky nutný pre významnosť na úrovni 5 % bol 7 pre n = 10 a 11 pre n = 20.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Probiotická zmes na podporu rastu hydiny, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že je tvorená v podstate sušenými životaschopnými stabilnými mikrosférmi *Enterococcus faecium* 301, ATCC 55059, na báze mastnej kyseliny a sušenými životaschopnými stabilnými mikrosférmi *Enterococcus faecium* 202, ATCC 53519, na báze mastnej kyseliny.

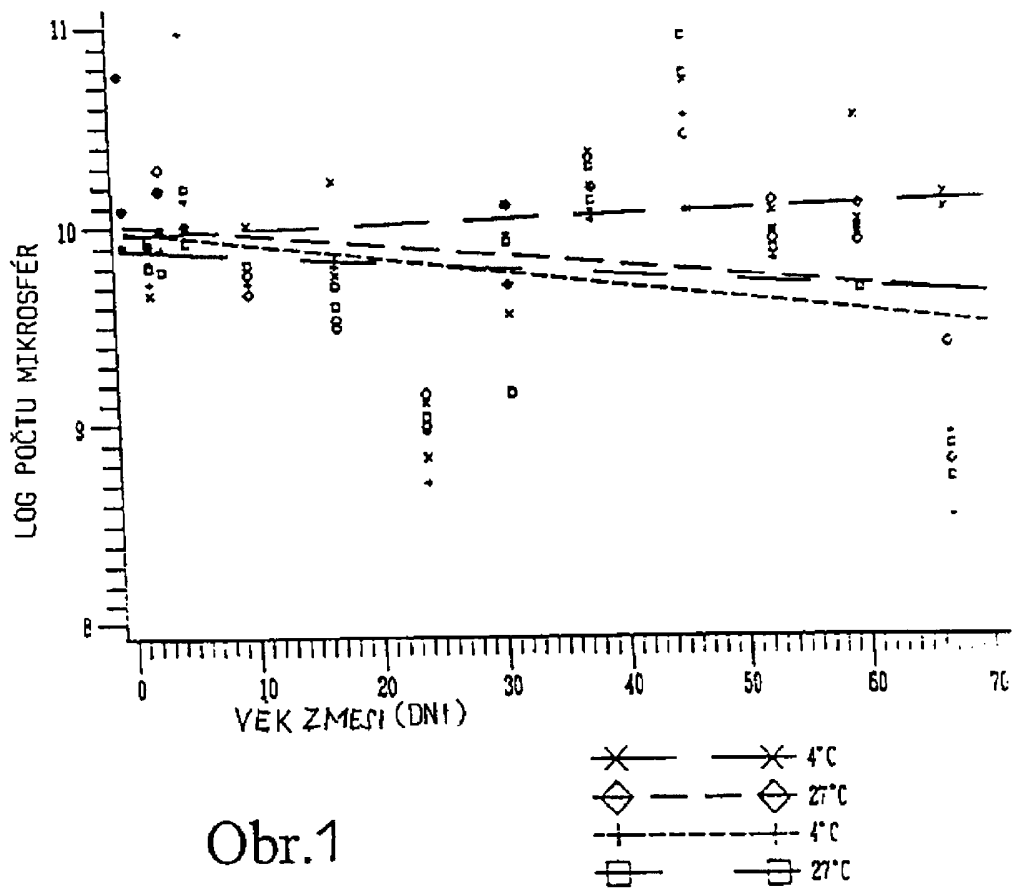
2. Probiotická zmes podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje 30 až 70 % jedného enterokoku a 70 až 30 % druhého z uvedených enterokokov.

3. Probiotická zmes podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že mastnou kyselinou je voľná mastná kyselina s počtom atómov uhlíka C₁₂ až C₂₄.

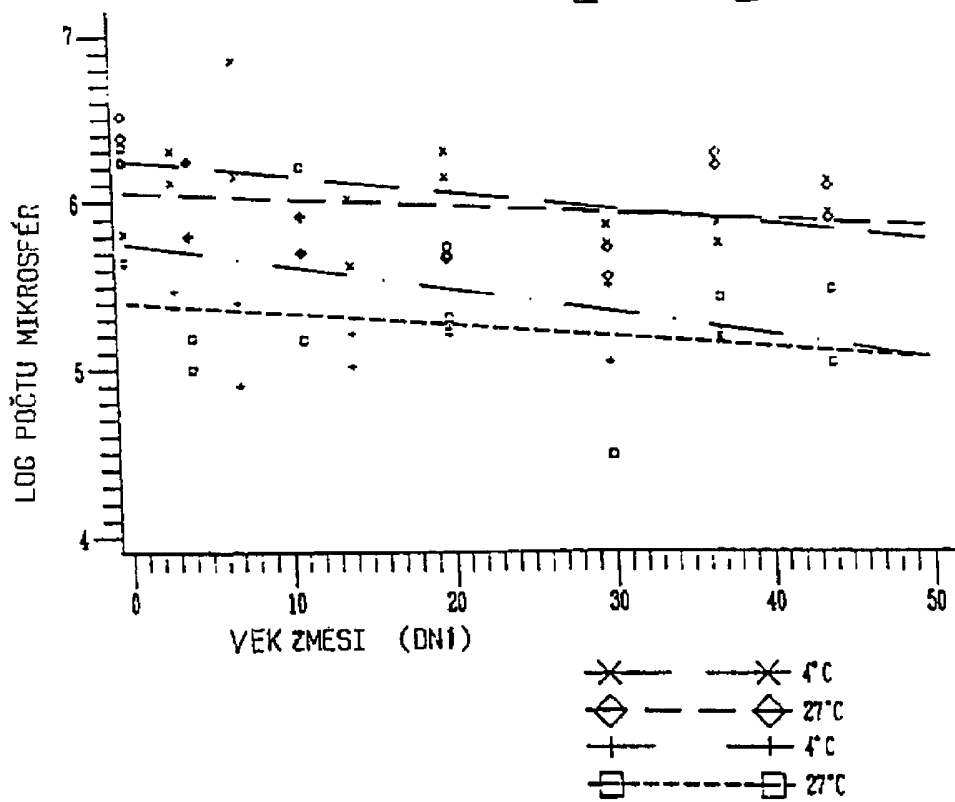
4. Probiotická zmes podľa nároku 3, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že voľnou mastnou kyselinou je kyselina stearová.

5. Probiotická zmes podľa nároku 4, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že enterokokové mikroorganizmy sú prítomné v rovnakom množstve.

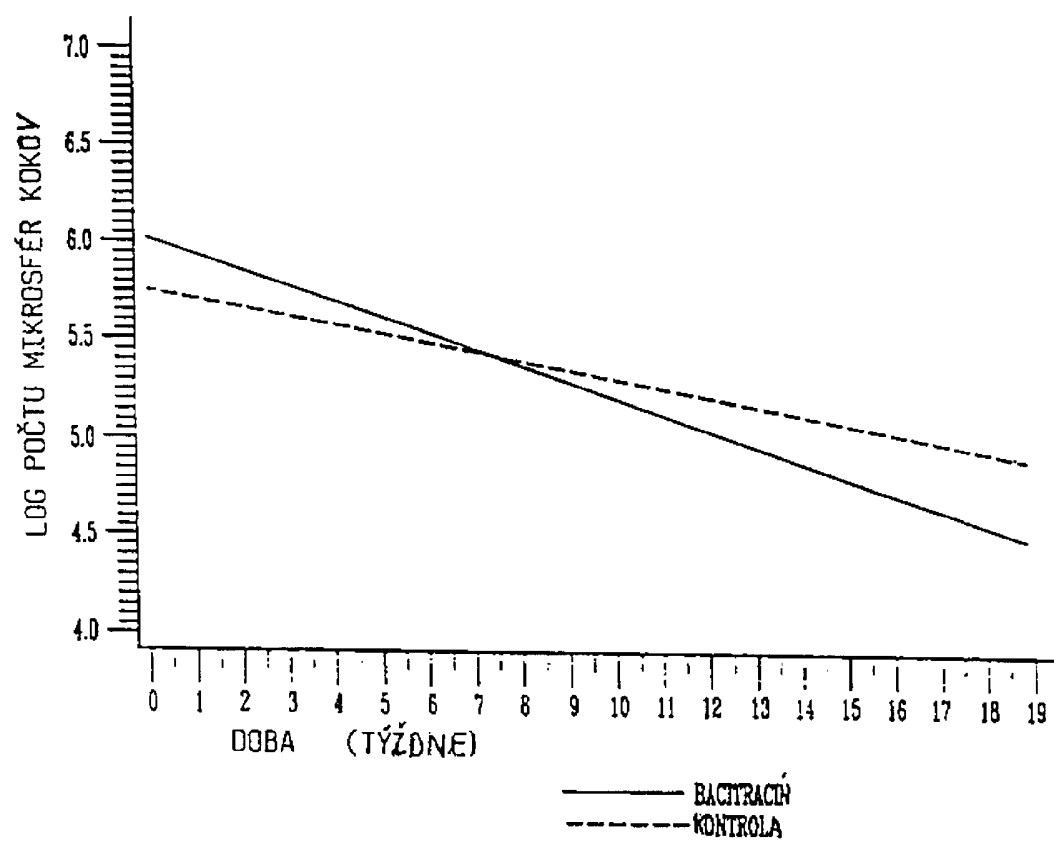
4 výkresy



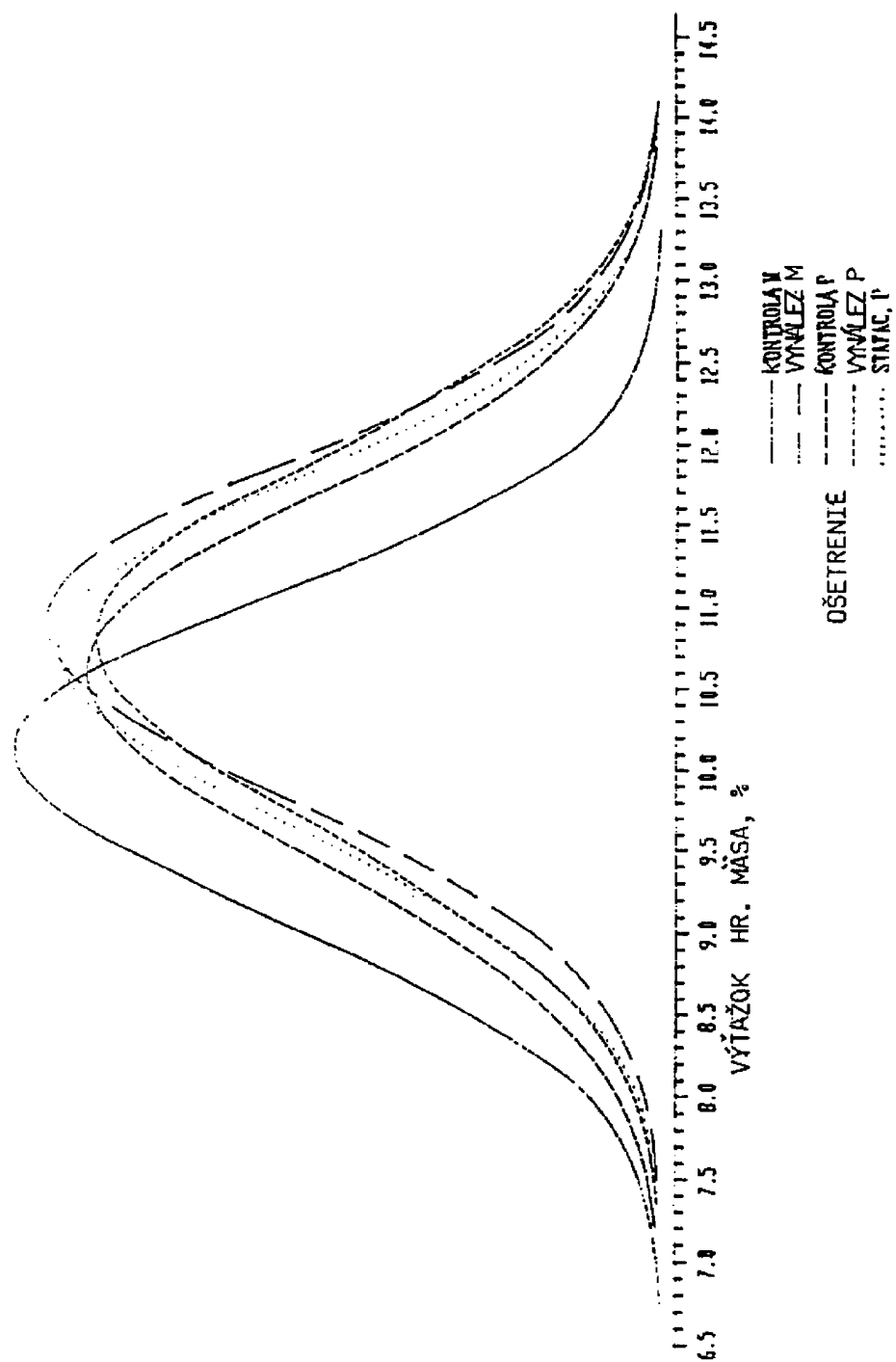
Obr.1



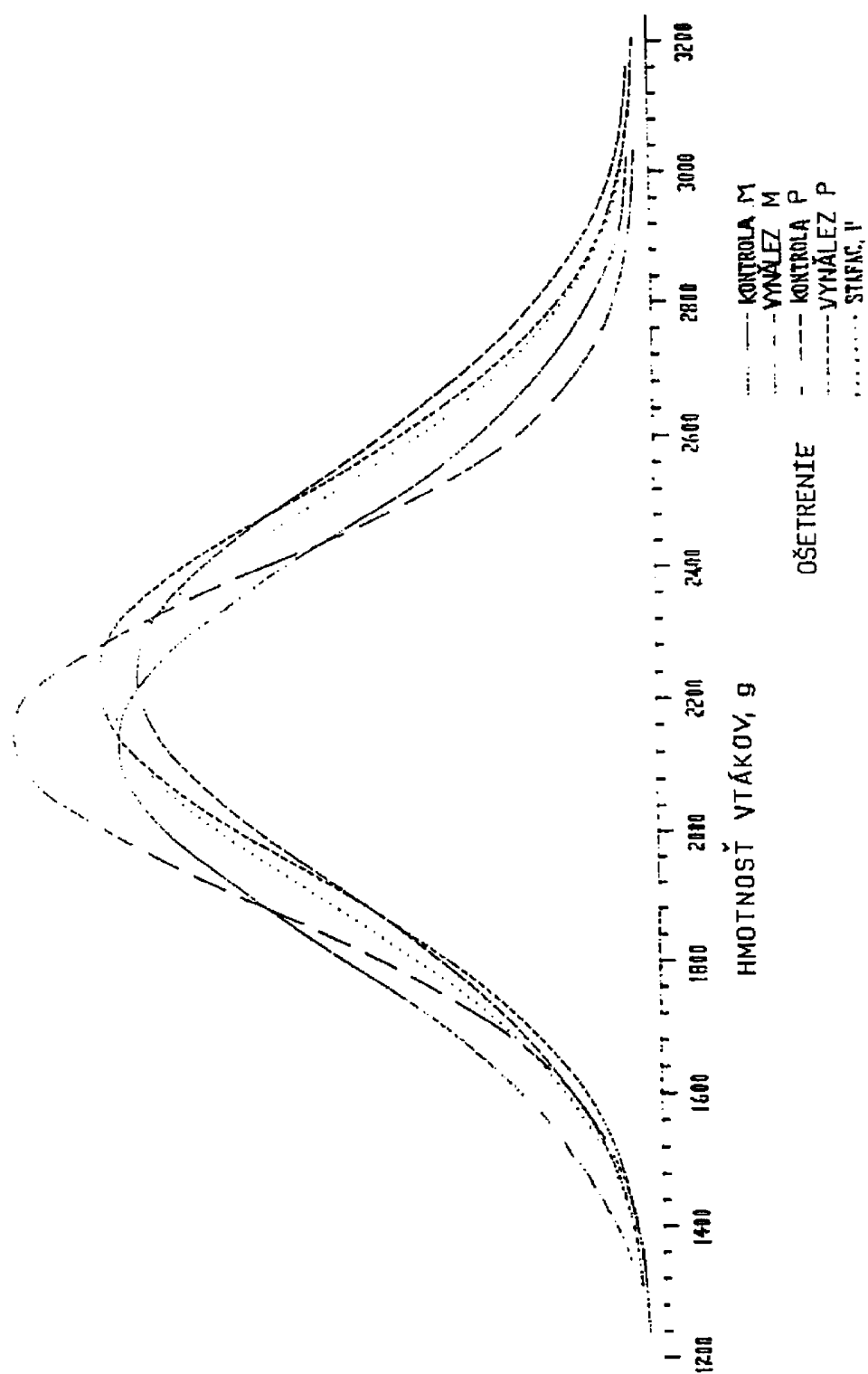
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr.5