



УКРАЇНА

(19) UA (11) 86984 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СЕРЕДНЬОЛАНЦЮГОВІ ЖИРНІ КИСЛОТИ ЯК ПРОТИМІКРОБНІ ЗАСОБИ

1

2

(21) a200700524

(22) 30.06.2005

(24) 10.06.2009

(86) PCT/EP2005/007067, 30.06.2005

(31) PCT/EP2004/007106

(32) 30.06.2004

(33) EP

(46) 10.06.2009, Бюл.№ 11, 2009 р.

(72) БРУДЖМАН ГІРТ, БЕ, МОЛЛІ КОЕН, БЕ

(73) НУТРИШН САЕНСІС НВ, БЕ

(56) Marounek M. Susceptibility of Escherichia coli to C2-C18 fatty acids. Folia Microbiol (praha), 2003;48(6):731-5 (реферат)

Sprong R.C. Bactericidal activities of milk lipids. Antimicrob. Agents Chemother., Apr. 2001; p.1298-1301

WO 01/97799 A, 27.12.2001

US 5569461 A, 29.10.1996

US 4489097 A, 18.12.1984

WO 98/09520 A, 12.03.1998

(57) 1. Застосування їстівної композиції, що включає нутрицевтичну добавку, вказана нутрицевтична добавка містить суміш капронової кислоти (C₆) та каприлової кислоти (C₈) середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК) чи солей, або містить суміш капронової кислоти (C₆) та капринової кислоти (C₁₀) СЛЖК чи солей, де концентрація СЛЖК у вказаній композиції складає від 100 до 3000мгн⁻¹, для інгібування росту та/або для зниження кількості патогенів Escherichia coli.

2. Застосування за п.1, що знижує кількість мікробних патогенів більше ніж на 25%.

3. Застосування за п.1 або 2, при цьому згадані СЛЖК застосовують у загальній ваговій кількості 0,3 %.

4. Застосування за будь-яким з пп.1-3, при цьому співвідношення C₆ та C₈ у суміші становить від 2:1 до 1:2, переважно становить 1:1.

5. Застосування за будь-яким з пп.1-3, при цьому співвідношення C₆ та C₁₀ в суміші становить від 2:1 до 1:2, переважно становить 1:1.

6. Застосування за будь-яким з пп.1-5, при цьому СЛЖК являють собою синтезовані СЛЖК.

7. Застосування за будь-яким з пп.1-6, при цьому СЛЖК застосовують у формі вільних СЛЖК, у формі моно-, ди- та/або тригліцеридів, у формі NH₄⁺-, Na⁺-, K⁺- та/або Ca²⁺-солей або у формі емульсії.

8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів 1-7 для контролю та регулювання мікробної екосистеми в шлунково-кишковому тракті будь-якої тварини або людини.

9. Їстівна композиція для інгібування росту та/або для зниження кількості патогенів Escherichia coli, що включає нутрицевтичну добавку, яка містить суміш капронової кислоти (C₆) та каприлової кислоти (C₈) СЛЖК чи солей, або містить суміш капронової кислоти (C₆) та капринової кислоти (C₁₀) СЛЖК чи солей, де концентрація СЛЖК у вказаній композиції складає від 100 до 3000 мгн⁻¹.

10. Композиція за п.9 для зниження кількості мікробних патогенів більше ніж на 25%.

11. Композиція за п.9 або 10, в якій застосовано згадані СЛЖК в загальній ваговій кількості 0,3%.

12. Композиція за будь-яким з пп.9-11, що включає нутрицевтичну добавку, при цьому співвідношення C₆ та C₈ в суміші становить від 2:1 до 1:2, переважно становить 1:1.

13. Композиція за будь-яким з пп.9-11, що включає нутрицевтичну добавку, при цьому співвідношення C₆ та C₁₀ в суміші становить від 2:1 до 1:2, переважно становить 1:1.

14. Композиція за будь-яким з пп.9-13, що включає нутрицевтичну добавку, в якій СЛЖК застосовують у формі вільних СЛЖК, у формі моно-, ди- та/або тригліцеридів, у формі NH₄⁺-, Na⁺-, K⁺- та/або Ca²⁺-солей або у формі емульсії.

15. Спосіб інгібування росту та/або зниження кількості патогенів Escherichia coli, у тварини або людини, при цьому спосіб включає згодовування згаданих тварин або людини ефективної кількості композиції за будь-яким з пп.9-13.

16. Спосіб інгібування росту та/або зниження кількості патогенів Escherichia coli, в продукті харчування, отриманому від тварини, при цьому спосіб включає згодовування згаданих тварини ефективної кількості композиції за будь-яким з пп.9-13.

(13) C2

(11) 86984

(19) UA

Винахід стосується застосування середньолаиножових жирних кислот (СЛЖК) або їхніх солей або похідних або сумішей в якості специфічних інгібіторів мікробного зараження та мікробного росту. Зокрема, винахід стосується застосування капронової (C₆), каприлової (C₈) та капринової (C₁₀) кислот, їхніх солей, похідних або сумішей для інгібування росту мікробних патогенів харчового походження, головним чином *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia* sp. та *Enterococcus* sp.

Мікробні штами, що впливають на здоров'я тварини та людини, включають *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, плісневі гриби тощо. Наприклад, *Campylobacter* фактично є одним з найпоширеніших у світі людських ентеропатогенів, що викликають кампілобактеріоз. Кампілобактеріоз на цей час є головною зоонозою причиною людської запальної кишкової інфекції, яка випереджає за поширеністю сальмонельоз та лістерельоз. Клінічні ознаки кишкових хвороб, спричинених інфекцією *Campylobacter*, змінюються в діапазоні від загалом помірної незапальної діареї до тяжкої запальної діареї з фекальною кров'ю та лейкоцитами [Scott et al., 1997; Friedman et al., 2000; Oberhelman and Taylor, 2000].

За повідомленнями, захворюваність на людський кампілобактеріоз в Європі варіює в діапазоні від 9,5 випадків щороку на 100000 жителів у Іспанії до 108 випадків щороку на 100000 жителів у Шотландії. Ці цифри можуть бути занижені, оскільки багато випадків захворювання офіційно не реєструються, а діагностичні засоби в різних країнах відрізняються. У більшості європейських країн захворюваність продовжує підвищуватися.

Campylobacter також є однією з найпоширеніших бактеріальних причин диспептичного захворювання у Сполучених Штатах. Практично всі випадки захворювання є окремими, спорадичними явищами, а не частиною великих спалахів. Активне спостереження за допомогою US FoodNet виявило, що на кожні 100000 осіб припадає близько 15 діагностованих випадків захворювання кожного року. Набагато більше випадків залишаються невиявленими або незареєстрованими, і було підраховано, що кампілобактеріоз вражає щороку понад 1 мільйон людей, або 0,5% загального населення.

Крім того, інфекції *Campylobacter* також пов'язані з синдромом Гійєна-Барре та артритом [Scott et al., 1997; Nachamkin et al., 1998]. Смертність, пов'язана з інфекціями *Campylobacter*, відносно низька, і для переважної більшості пацієнтів будь-яке специфічне лікування не потрібне. Хоча *Campylobacter*, як правило, не приводить до смерті, було підраховано, що кожного року можуть померати близько 100 осіб, інфікованих *Campylobacter*. Проте інфекції *Campylobacter*, тим не менше, являють собою серйозну проблему через високу кількість випадків та спричинені ними неврологічні симптоми, а також високі соціальні та економічні витрати, зумовлені захворюванням. Суспільство несе високі економічні витрати внаслідок втрати робочого часу, значної вартості лікування та медикаментів (головним чином фторхінолонів та макролідів). Крім того, трапляються

системні інфекції, наприклад, у пацієнтів похилого віку або у пацієнтів з імунною недостатністю, таких як ВІЛ-інфіковані особи. В той час як середня тривалість життя у європейців постійно підвищується, можна очікувати більш серйозних ускладнень від інфекцій *Campylobacter*, особливо у випадках, пов'язаних із пацієнтами похилого віку.

Проблема захворюваності, що підвищується, або постійно високої захворюваності людськими інфекціями харчового походження не може бути вирішена на основі інформації, відомої на цей час. Встановлення й підтримання підвищених гігієнічних стандартів вплинуло на сальмонельоз, але не на кампілобактеріоз. Наявна інформація не вирішує цих проблем, оскільки досі не існує розуміння механізмів, завдяки яким зоонозні бактерії здійснюють проникнення та інфікування [Scott et al., 1997; Oberhelman and Taylor, 2000; Newell and Nachamkin, 1992].

Спалахи кампілобактеріозу часто спостерігаються у зв'язку з використанням зараженого молока або води, тоді як загальними причинами спорадичних випадків є вживання недовареного чи недосмаженого м'яса, наприклад, свійської птиці. Заражені кури, безумовно, є основними носіями інфекції [Friedman et al., 2000; Corry and Atabay, 2001; Newell and Wagenaar, 2000].

Свійська птиця є основним резервуаром для *Campylobacter jejuni*, в якому бактерії містяться всередині шлунково-кишкового тракту. Епідеміологія *C. jejuni* в стаді бройлерів досі невияснена. Загалом, птахи стають інфікованими у віці близько 3 тижнів, але джерела та шляхи передачі мікроорганізмів бройлерам на фермах залишаються невідомими. Нещодавно отримані дані показали наявність декількох джерел інфекції, включаючи воду, диких птахів та персонал ферм (Corry and Atabay, 2001). Після попадання мікроорганізму в стадо, він поширюється дуже швидко, що призводить до інфікування майже всіх птахів за дуже короткий час. Хоча рівень *Campylobacter* у сліпих кишках курей за повідомленнями становить від 10⁵ до 10¹⁰/г, така щільна колонізація не викликає жодних ознак хвороби. Високі кількості *Campylobacter* у випорожненнях птахів викликають подальше перехресне зараження тушок *Campylobacter*-негативних курей на переробних підприємствах. В результаті *Campylobacter* заражає 50-80% сирих тушок курей, у залежності від географічного регіону, де проводилося дослідження, та застосовуваної методики. Цей факт, у поєднанні з відносно низькою дозою, необхідною для інфікування людини, пояснює, чому вживання недоварених чи недосмажених птахів викликає більшість спорадичних випадків кампілобактеріозу. Тому однією з задач є з'ясування того, як блокувати або знизити кишкову колонізацію *Campylobacter* у зоонозних тваринах-хазяях, наприклад, свійській птиці.

Сучасними засобами гігієни та біозахисту є покращення біозахисту на інкубаторних станціях, технологія конкурентного виключення або використання хлорованої води [Corry and Atabay, 2001; Newell and Wagenaar, 2000]. Але цього недостатньо для контролю або усунення *Campylobacter* з

харчового ланцюга свійської птиці. Інша стратегія включає профілактичне введення тваринам антибіотиків (прискорювачів росту). Проте за останні роки виникли питання щодо потенційної шкоди для здоров'я людей залишків таких антибіотиків та щодо появи резистентних штамів патогенних бактерій з тваринних джерел, а крім того, підвищується тиск на контрольні органи з метою заборони застосування цих прискорювачів росту [Barton, 1998; Dupont and Steele, 1987; Guillot, 1989; Prescott, 1997]. Тому можна передбачити загальну заборону антибіотиків до кінця 2005 року. Нарешті, іншим альтернативним підходом до контролю зараження *Campylobacter* може бути активна імунізація птиці. Проте на цей час існує лише обмежена інформація про функціонування імунної системи курей. Хоча деякі міжнародні дослідницькі заклади працюють в цьому напрямі, дійсний прорив цієї технології можливий лише в майбутньому.

Таким чином, терміново потрібні альтернативні підходи до контролю патогенів харчового походження та іншого мікробного зараження, зокрема, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli* тощо.

Задачею цього винаходу є створення альтернативного підходу до контролю кількості та росту патогенів харчового походження та іншого мікробного зараження.

Зокрема, задачею винаходу є створення композицій та способів для зниження кількості та/або росту патогенів харчового походження та мікробних організмів у споживчих (харчових) продуктах. Іншою задачею винаходу є створення композицій та способів для зниження кількості та/або росту патогенів харчового походження та мікробних організмів у тварин або людей. Винахід оснований на застосуванні специфічних середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК) та, зокрема, капронової кислоти (C_6), каприлової кислоти (C_8) та капринової кислоти (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для контролю мікробного зараження та росту.

Винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для інгібування росту мікробних патогенів, зокрема, для інгібування росту мікробних патогенів харчового походження. Цей винахід оснований на спостереженні, що специфічні середньоланцюгові жирні кислоти C_6 та/або C_8 та/або C_{10} , їхні солі або похідні або суміші у вигляді розчину або емульсії спричиняють протимікробні ефекти на мікробні патогени та сприяють інгібуванню подальшого росту цих мікробних патогенів та суттєвому зниженню їх кількостей. Ці патогени являють собою бактерії, зокрема, такі як *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp.

Таким чином, в першому аспекті винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, у загальній ваговій кількості нижче 5%,

переважно від 0,01% до 5%, для інгібування росту та/або для зниження кількості мікробних патогенів. Зокрема, СЛЖК застосовують у загальній ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3% для інгібування росту мікробних патогенів.

Застосування цих кількостей СЛЖК C_6 та/або C_8 та/або C_{10} не тільки сприяє інгібуванню росту мікробних патогенів, але також сприяє знищенню патогенів харчового походження. Ці малі кількості специфічних СЛЖК несподівано виявилися достатніми для забезпечення значного протимікробного ефекту без суттєвих побічних та/або шкідливих ефектів на мікробну флору в шлунково-кишковому тракті.

В цьому винаході переважним є застосування суміші різних специфічних жирних кислот. Автор виявив, що така суміш показує оптимальні протимікробні властивості по відношенню до мікробних штамів.

В особливо переважному варіанті здійснення винаходу СЛЖК застосовують у формі вільних жирних кислот, або у формі суміші однієї або більше їхніх солей або похідних, щоб запобігти виділенню композицією неприємного запаху. Жирні кислоти, що можуть бути застосовані у цьому винаході, включають жирні кислоти з парною кількістю атомів вуглецю. У переважному варіанті здійснення застосовувані СЛЖК включають суміш (капронової кислоти, гексанової кислоти) та C_8 (каприлової кислоти, октанової кислоти), суміш C_8 та C_{10} (капринової кислоти, деканової кислоти), суміш C_6 та C_{10} , або суміш СЛЖК C_6 , C_8 та C_{10} .

Протимікробні ефекти жирних кислот та їхніх солей вже давно відомі та описані [J.J. Kabara (1978) у "The pharmacological effects of lipids"]. У вказаному огляді стверджується, що в гомологічних рядах жирних кислот бактерицидна ефективність підвищується зі збільшенням довжини ланцюга. За спостереженнями автора, *E. coli* spp. та *Shigella* spp. знищуються помірними концентраціями насичених миль лауринової кислоти, що містить 12 атомів вуглецю, та стеаринової жирної кислоти, що містить 18 атомів вуглецю. Також за спостереженнями, жирні кислоти з довжиною ланцюга близько 12 атомів вуглецю показують оптимальну протимікробну активність, тоді як нижчі жирні кислоти з 4-10 атомами вуглецю, судячи з усього, зовсім не показують або показують незначний бактерицидний ефект.

Механізм, за допомогою якого жирні кислоти виявляють протимікробну активність, детально описаний в літературі. Прийнята на цей час теорія полягає в тому, що ліпідна мембрана мікробної клітини є проникною для недисоційованої жирної кислоти, завдяки чому жирна кислота може проходити крізь мембрану мікробної клітини в напрямі більш лужного середовища. Внаслідок вищої внутрішньоклітинної лужності жирна кислота дисоціює, що призводить до падіння внутрішньоклітинної рН нижче рівня виживання. Таким чином, жирна кислота фактично діє як протонатор, що підвищує вхід H^+ в клітину, при цьому вихід H^+ надто повільно

ний, щоб дозволити внутрішньоклітинний рН знову підвищитися. Фізико-хімічні властивості жирних кислот, що зумовлюють їх дію в якості протонаторів, можуть змінюватися та залежать від численних параметрів. Прикладами таких параметрів є довжина ланцюга та рКа жирної кислоти, а також фізико-хімічне середовище, осадження, рН у місці дії та хімічний склад мікробної оболонки, що зумовлює проходження жирних кислот крізь мембрану.

У зв'язку з цим, кращі властивості жирної кислоти, що містить C_6 та/або C_8 та/або C_{10} атомів вуглецю, можна пов'язати з надзвичайно високою проникністю мембран мікробних клітин для цієї жирної кислоти. Це виявилось несподіваним, оскільки у Kabara (1978) зазначено, що нижчі жирні кислоти, які містять 4-10 атомів вуглецю, показують низьку бактерицидну активність. Підвищення рН з 6,5 до 7,5 підвищило мінімальну інгібіторну концентрацію коротколанцюгових жирних кислот, які містять 6-8 атомів вуглецю, та знизило мінімальні концентрації двох СЛЖК, які містять 12-14 атомів вуглецю (лауринової, міристинової кислоти).

Проте у Kabara (1978) немає жодних посилань на те, що жирні кислоти, які містять C_6 та/або C_8 та/або C_{10} атомів вуглецю, можуть бути здатними контролювати та навіть інгібувати мікробний ріст.

Ця протимікробна дія згаданих специфічних СЛЖК (C_6 та/або C_8 та/або C_{10}) у наведених вище концентраціях по відношенню до мікробних штамів не була описана раніше. Внаслідок інгібування та знищення мікробних патогенів, ці мікробні патогени вже не здатні спричиняти відповідні захворювання.

Таким чином, СЛЖК C_6 , C_8 та C_{10} , або їхні солі, похідні або суміші, інгібують ріст патогенів харчового походження, зокрема, шляхом знищення цих патогенів. Винахід стосується застосування СЛЖК специфічного малого діапазону (C_6 та/або C_8 та/або C_{10}) у вищезгаданих низьких концентраціях у якості протимікробних засобів. Цей специфічний діапазон дозволяє інгібувати розмноження патогенів харчового походження шляхом знищення мікробних клітин.

Можливі області застосування включають усі випадки, коли мікробне зараження є небажаним та вимагає спостереження та контролю. Тому специфічні СЛЖК можуть бути застосовані у порошкоподібних та рідких харчових та кормових продуктах, в області медичного забезпечення людей (наприклад, у випадках діареї), для консервації харчових та кормових продуктів (фруктів, сиру, печива, хліба тощо), у напоях, у засобах для чищення (дезінфекції) та миючих засобах і т.ін. Завдяки їх застосуванню контроль мікробного росту може бути здійснений менш шкідливим для здоров'я шляхом порівняно із застосуванням традиційних сполук, таких як прискорювачі росту, антибіотики тощо.

Наведені нижче приклади доводять протимікробну ефективність застосування СЛЖК C_6 та/або C_8 та/або C_{10} у вищезгаданих концентраціях у якості протимікробних засобів. Слід розуміти, що ці приклади наведені лише для пояснення та не об-

межують обсягу винаходу, викладеного у формулі винаходу.

Опис малюнків

На Фіг.1-3 показано ефект СЛЖК C_{10} на ріст та виживання різних штамів *Campylobacter* sp., виділених зі сліпої кишки свійської птиці.

На Фіг.4-6 показано ефект СЛЖК C_8 на ріст та виживання різних штамів *Campylobacter* sp., виділених зі сліпої кишки свійської птиці.

На Фіг.7-9 показано ефект СЛЖК C_6 на ріст та виживання різних штамів *Campylobacter* sp., виділених зі сліпої кишки свійської птиці.

У першому варіанті здійснення винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для інгібування росту та/або для зниження кількості мікробних патогенів, зокрема, для інгібування росту та/або для зниження кількості патогенів харчового походження.

В особливо переважному варіанті здійснення винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для зниження кількості мікробних патогенів більше ніж на 25%, переважно більше ніж на 50%, ще більш переважно більше ніж на 75% та найбільш переважно до 100%.

Вираз "мікробні патогени" тут стосується мікроорганізмів, що мають патогенний характер, тобто, здатні викликати захворювання або розлади у тварин та/або людей.

Вираз "патогени харчового походження" тут стосується мікробних патогенів, що заражають харчові або кормові продукти. Ці патогени включають бактерії, наприклад, такі як *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*.

Вираз "СЛЖК" тут стосується середньоланцюгової жирної кислоти, при цьому згадана "середньоланцюгова жирна кислота" означає насичену жирну кислоту, ненасичену жирну кислоту, або їхню суміш, що містить від 6 до 10 атомів вуглецю. Вираз "середньоланцюгова насичена жирна кислота" тут стосується C_6 (капронової), C_8 (каприлової), C_{10} (капринової) кислоти, або будь-яких їхніх сумішей.

Вираз "сіль СЛЖК" тут стосується солі вільної жирної кислоти. Вираз "вільна жирна кислота" тут стосується жирної кислоти, не перетвореної на похідне, тобто, не перетвореної на сіль, амід, ефір тощо.

Вираз "похідне СЛЖК" тут стосується середньоланцюгової жирної кислоти, карбоксильна група якої є оборотно перетвореною на іншу групу з утворенням амідів, ефірів, гліцеридів. В цьому описі вираз "похідне СЛЖК" не включає сіль СЛЖК.

Зокрема, винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для інгібування росту *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*,

Campylobacter laris, *Campylobacter upsaliensis*, та/або інших *Campylobacter* sp.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, для інгібування росту *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* та/або *Salmonella Java*.

В одному з варіантів здійснення винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, у загальній ваговій кількості, нижчій ніж 5%, переважно нижчій ніж 3%, нижчій ніж 1%, або навіть нижчій ніж 0,1%, для інгібування росту та/або для зниження кількості мікробних патогенів.

У переважному варіанті здійснення капронову кислоту (C_6), її солі або похідні застосовують у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%. В іншому переважному варіанті здійснення каприлову кислоту (C_8), її солі або похідні застосовують у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%. В наступному переважному варіанті здійснення капринову кислоту (C_{10}), її солі або похідні застосовують у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення застосовують суміш капронової кислоти (C_6) та каприлової кислоти (C_8). Застосування суміші каприлової кислоти (C_8) та капринової кислоти (C_{10}) також входить до області винаходу. В наступному переважному варіанті здійснення застосовують суміш капронової кислоти (C_6) та капринової кислоти (C_{10}). Крім того, в іншому варіанті здійснення винахід може стосуватися застосування суміші капронової кислоти (C_6), каприлової кислоти (C_8) та капринової кислоти (C_{10}).

В цьому винаході можуть використовуватися різні суміші СЛЖК капронової кислоти (C_6), каприлової кислоти (C_8) та капринової кислоти (C_{10}), а також різні співвідношення СЛЖК в таких сумішах. Переважно, співвідношення C_6 та C_8 у суміші C_6/C_8 становить від 2:1 до 1:2, переважно 1:1. В іншому переважному варіанті здійснення співвідношення C_8 та C_{10} у суміші C_8/C_{10} становить від 2:1 до 1:2, переважно 1:1. В наступному переважному варіанті здійснення співвідношення C_6 та C_{10} у суміші C_6/C_{10} становить від 2:1 до 1:2, переважно 1:1. В наступному переважному варіанті здійснення співвідношення C_6 та C_8 та C_{10} у суміші $C_6/C_8/C_{10}$ може складати 1:1:2 або 1:2:1 або 2:1:1 або 1:2:2 or 2:1:2 або 2:2:1 або 1:1:1, переважно 1:1:1.

У переважному варіанті здійснення винаходу капронову кислоту (C_6) та каприлову кислоту (C_8) застосовують у приблизно рівних вагових кількос-

тях. Переважно, капронову кислоту (C_6) та каприлову кислоту (C_8) застосовують у загальній ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення винахід також стосується застосування каприлової кислоти (C_8) та капринової кислоти (C_{10}) у приблизно рівних вагових кількостях. Переважно, каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}) застосовують у загальній ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення капронову кислоту (C_6) та капринову кислоту (C_{10}) застосовують у приблизно рівних вагових кількостях.

Переважно, капронову кислоту (C_6) та каприлову кислоту (C_{10}) застосовують у загальній ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}) застосовують у приблизно рівних вагових кількостях. Переважно, капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}) застосовують у загальній ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення СЛЖК застосовують у формі синтезованих СЛЖК. Вираз "синтезована СЛЖК" тут стосується молекули СЛЖК, що містить хімічну бокову групу, таку як алкільна група, переважно C_1 - C_{10} -алкіл, наприклад, металну або етильну групу. У переважному варіанті здійснення СЛЖК являють собою металні, етильні похідні або інші синтезовані похідні.

В наступному варіанті здійснення СЛЖК за винаходом можуть бути застосовані в різних формах. Наприклад, винахід може стосуватися застосування СЛЖК, визначених тут, при цьому СЛЖК застосовують у формі вільних СЛЖК, у формі моно-, ди- та/або тригліцеридів, у формі NH_4^+ , Na^+ , K^+ та/або Ca^{2+} -солей або у формі емульсії.

В наступному варіанті здійснення СЛЖК застосовують у комбінації з іншою СЛЖК, наприклад, лауриною (C_{12}) та міристиною (C_{14}) кислотою, іншими протигрибковими засобами або іншими (органічними чи неорганічними) (жирними) кислотами або добавками, такими як ароматизатори та рослинні екстракти.

Приклади інших органічних кислот включають, наприклад, карбонові кислоти C_{1-12} , вибрані з групи, що включає незаміщені карбонові кислоти, такі як мурашина кислота, оцтова кислота, пропіонова кислота, масляна кислота, валеріанова кислота та капронова кислота, заміщені карбонові кислоти,

такі як адипінова кислота, малеїнова кислота, сукцинова кислота, лимонна кислота, фумарова кислота, винна кислота, молочна кислота, глюконова кислота, яблучна кислота та аскорбінова кислота, включаючи циклічні карбонові кислоти, такі як піколінова кислота. Компонент на основі органічних кислот може являти собою окрему незаміщену карбонову кислоту, окрему заміщену карбонову кислоту, суміш незаміщених карбонових кислот, суміш заміщених карбонових кислот та суміш незаміщених карбонових кислот та заміщених карбонових кислот, включаючи насичені, ненасичені, циклічні та аліфатичні карбонові кислоти та їхні комплекси з металами й солі. Також можуть бути застосовані окремі рацемічні форми та рацемічні суміші.

Приклади неорганічних кислот включають, зокрема, сильні неорганічні кислоти у малих кількостях, такі як перхлорна кислота, йодистоводнева кислота, бромистоводнева кислота, соляна кислота, сірчана кислота та азотна кислота, а також слабкі неорганічні кислоти, такі як фосфорна кислота, фтористоводнева кислота, хлорноватиста кислота та азотиста кислота, але не обмежуються ними.

Наступний аспект винаходу стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, переважно у загальній ваговій кількості нижче 5% та переважно від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3% у якості добавки для консервації харчових та кормових продуктів.

В іншому аспекті винахід стосується застосування середньоланцюгових жирних кислот (СЛЖК), вибраних з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхніх солей, похідних або сумішей, переважно у загальній ваговій кількості нижче 5%, переважно від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%, для контролю та регулювання мікробної екосистеми в шлунково-кишковому тракті будь-якої тварини або людини.

В наступному аспекті винахід стосується їстівної композиції для інгібування росту та/або зниження кількості мікробних патогенів, яка містить харчову добавку, що включає середньоланцюгові жирні кислоти (СЛЖК), вибрані з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхні солі, похідні або суміші, при цьому згадані СЛЖК присутні у харчовій добавці у ваговій кількості нижче 5%, переважно від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

Вираз "їстівна композиція" за винаходом слід розуміти як кормовий або харчовий продукт, що може споживатися твариною чи людиною.

Вираз "харчова добавка" тут стосується речовини, що додають в малих кількостях в їстівну композицію для покращення згаданої композиції, при цьому слід розуміти, що вона є придатною для вживання твариною чи людиною.

В особливо переважному варіанті здійснення композиція за винаходом здатна знижувати кількість мікробних патогенів більше ніж на 25%, переважно більше ніж на 50%, ще більш переважно більше ніж на 75% та найбільш переважно до 100%. СЛЖК, присутні у композиції, можуть бути представлені у вигляді різноманітних сумішей, співвідношень, кількостей та рецептур, як зазначено вище. Переважно, композиція включає харчову добавку, в якій застосовано суміш C_6 та C_8 , в якій застосовано суміш C_8 та C_{10} , в якій застосовано суміш C_6 та C_{10} , в якій застосовано суміш C_6 , C_8 та C_{10} .

Більш переважно, композиція включає харчову добавку, в якій капронова кислота (C_6) та каприлова кислота (C_8) присутні у приблизно рівних вагових кількостях, переважно у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%. В іншому варіанті здійснення композиція включає харчову добавку, в якій каприлова кислота (C_8) та капринова кислота (C_{10}) присутні у приблизно рівних вагових кількостях, переважно у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%. В наступному варіанті здійснення композиція включає харчову добавку, в якій капронова кислота (C_6) та капринова кислота (C_{10}) присутні у приблизно рівних вагових кількостях, переважно у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%. В наступному варіанті здійснення композиція включає харчову добавку, в якій капронова кислота (C_6), каприлова кислота (C_8) та капринова кислота (C_{10}) присутні у приблизно рівних вагових кількостях, переважно у ваговій кількості від 0,01% до 5%, переважно від 0,05% до 5%, переважно від 0,1% до 2,5%, більш переважно від 0,25% до 1,5% та найбільш переважно у ваговій кількості 0,3%.

В наступному переважному варіанті здійснення концентрація СЛЖК в композиції становить від 100 до 3000мгн⁻¹, переважно від 300 до 2000мгн⁻¹, і/переважно від 500 до 1500мгн⁻¹ та найбільш переважно близько 1200мгн⁻¹.

В наступному варіанті здійснення винахід стосується композиції, що містить А) ефективну кількість першої СЛЖК, вибраної з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхні солі та похідні, при цьому згадана СЛЖК переважно присутня у ваговій кількості нижче 5%, та В) ефективну кількість другої СЛЖК, вибраної з групи, що включає капронову кислоту (C_6), каприлову кислоту (C_8) та капринову кислоту (C_{10}), їхні солі та похідні, при цьому згадана СЛЖК переважно присутня у ваговій кількості нижче 5%, в якості комбінованого препарату

для одночасного, окремого або почергового застосування для інгібування росту та/або для зниження кількості мікробних патогенів.

За винаходом, пропонується композиція для застосування в якості корму для тварин, вирощуваних для отримання м'яса. Вираз "тварини" тут стосується великої та дрібної худоби, зокрема, великої рогатої худоби, такої як жуйні тварини, овець, свиней, в тому числі свиноматок та кабанів, коней, та свійської птиці, а також їхнього потомства, такого як молочні поросята, підсвинки, телята, ягнята, лошата, курчата тощо. Також прикладами тварин, для яких пропонується композиція за винаходом, є риба, зокрема, вугор, короп, форель, райдужна форель, жовтохвіст, морський лящ, сріблястий лосось, золоті рибки, кольоровий короп, тропічні рибки; молюски; ракоподібні. Крім того, домашні тварини, такі як собаки, кішки, кролики, хом'яки та їхнє потомство, також є прикладами тварин, для яких є придатною композиція за винаходом. Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу, пропонується композиція для застосування в якості корму для тварин, вирощуваних для отримання молока, таких як корови, вівці, кози, коні тощо.

Вказана композиція дозволяє стимулювати добре функціонуючу та збалансовану мікробну екосистему в шлунково-кишковому тракті тварини. Контроль мікробної екосистеми в шлунково-кишковому тракті тварини дозволяє підвищити продуктивність та покращує здоров'я тварин. Підвищена продуктивність виражається у кращому щоденному прирості ваги та нижчому показнику засвоєння корму у вирощуваних тварин. Вираз "засвоєння корму" тут використовується для опису ефективності поглинання корму тваринами та розраховується як кількість вжитого корму, розділена на приріст ваги тварини за конкретний період. Вираз "коефіцієнт засвоєння корму" означає відношення кількості вжитого корму до приросту ваги тварини. Таким чином, застосування специфічного діапазону СЛЖК у вищезгаданих концентраціях за винаходом покращує показники засвоєння корму тваринами без супутнього суттєвого чи значного стимулювання поглинання корму. Вираз "покращення засвоєння корму" та споріднені вирази, такі як "покращене засвоєння корму" тут стосуються покращення ефективності використання корму та/або покращення швидкості росту. Тобто, за винаходом, тварини, що отримують композицію (порівняно з тваринами, що не отримують композицію) можуть мати по суті таку саму швидкість поглинання корму і при цьому мати підвищену швидкість росту, можуть мати знижену швидкість поглинання корму і при цьому мати по суті таку саму швидкість росту, або можуть мати знижену швидкість поглинання корму і при цьому мати підвищену швидкість росту. Вираз "ріст" тут стосується приросту ваги.

Контроль мікробної екосистеми в шлунково-кишковому тракті людей також дозволяє покращити їхнє здоров'я та добробут. Зокрема, це дозволяє знизити ризик зоонозних мікробних захворювань у людей, таких як кампілобактеріоз, сальмонельоз та ін.

Таким чином, в іншому варіанті здійснення винахід також стосується способу інгібування росту та/або зниження кількості мікробних патогенів, переважно вибраних з групи, що включає *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. та *Enterococcus* sp. у тварини або людини, при цьому спосіб включає введення згаданих тварині або людині ефективної кількості композиції, визначеної тут.

Крім того, композиція за винаходом дозволяє контролювати кількість мікробних патогенів у продуктах харчування, отриманих від тварин. Тому в наступному варіанті здійснення винахід також стосується способу інгібування росту та/або зниження кількості мікробних патогенів, переважно вибраних з групи, що включає *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., та *Enterococcus* sp., у продукті харчування, отриманому від тварини, при цьому спосіб включає введення згаданих тварині ефективної кількості композиції, визначеної тут.

Вираз "продукт харчування" тут стосується продукту, отриманого від тварини, що є їстівним та засвоюваним, такого як молоко, м'ясо, яйця, сир, сметана, масло і т. ін., а також будь-якого продукту, виготовленого з використанням цих їстівних продуктів у якості інгредієнту.

Вказаний спосіб забезпечує контроль мікробної екосистеми в шлунково-кишковому тракті тварини та зниження кількості мікробних патогенів у тварини. Внаслідок цього кількість тварин, заражених мікробними патогенами та/або ступінь їхнього зараження може бути знижена, а також може бути суттєво знижене введення мікробних патогенів у харчовий ланцюг та подальше перехресне зараження на переробних підприємствах.

Наступні приклади наведені лише для ілюстрації винаходу та жодним чином не обмежують його обсягу.

Приклади

Приклад 1: Вплив СЛЖК на ріст та виживання *C. jejuni* та *C. coli*.

У дослідження було включено вісім штамів *Campylobacter*. Два штами (*C. jejuni* LMG 6444^T/ATCC 33560 та *C. coli* LMG 6440^T/ATCC 33559) отримали у BCCMTM/LMG Bacteria Collection (Ghent University, Ghent, Belgium). Також в цьому дослідженні тестували шість неспоріднених штамів *Campylobacter* (5 *C. jejuni* та 1 *C. coli*), виділених з продуктів бельгійської свійської птиці та ідентифікованих на рівні виду за допомогою множинної ПЦР. Крім того, тестували три контрольні штами з визначеною антибіограмою, *S. aureus* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 та *E. coli* ATCC 25923.

В дистильованій воді приготували три десятикратні розведення 10% суспензії продукту СЛЖК (C_6 та C_8). C_6 та C_8 застосовували в рівних вагових кількостях (50/50). Таким чином, 10% суспензія містила 5% C_6 та 5% C_8 . Для отримання бажаних концентрацій 1,5, 0,75 та 0,36мл цих розведень вводили піпеткою в чашки Петрі та обережно змішували з 15мл розплавленого живильного середовища. Для цього використовували середовище Mueller-Hinton II (BBL) з pH7,2.

Штами *Campylobacter* вирощували в бульоні Brian Heart та інкубували при 37°C в мікро-аеробних умовах шляхом видалення 80% нормальної атмосфери та введення в судину газової суміші з 8% CO₂, 8% H₂ та 84% N₂. Інокуляти готували шляхом розведення культур, вирощених напередодні в бульоні Brian Heart (Oxoid, Basingstoke, UK), в буферизованому сольовому розчині до густини 0,5 за шкалою каламутності Мак-Фарленда та розводили у 40 разів перед інокуляцією. Пластини засівали приблизно 1×10⁵ CFU (колонієутворюючих одиниць) інокулятом Стірса. Контрольні пластини з обома середовищами без продукту інокулювали наприкінці процедури. Всі пластини інкубували при 37°C в мікро-аеробних умовах. Зчитування проводили через 48 годин. Реєстрували МІК (мінімальну інгібуючу концентрацію), що є найнижчою концентрацією, яка повністю інгібує ріст бактерій, не враховуючи слабкі ознаки росту одиничних колоній.

Таблиця 1

Величини МПС (%) продукту СЛЖК (C₆-C₈) проти різних штамів *Campylobacter*

| Штам | Номер | МПС |
|------------------|------------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | ATCC 33560 | 0,01 |
| <i>C. coli</i> | ATCC 33559 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | КН-03-1 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | КН-03-2 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | КН-03-3 | 0,005 |
| <i>C. jejuni</i> | КН-03-4 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | КН-03-5 | 0,01 |
| <i>C. coli</i> | КН-03-6 | 0,005 |

Результата, наведет в Таблиці 1, ясно показують, що специфічні СЛЖК C₆ та C₈ у вказаних концентраціях спричиняють інгібуючий ефект при pH7,2 на *C. jejuni* та *C. coli*. Бактеріальні штами були знищені.

Приклад 2: Вплив СЛЖК на *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* та *Enterococcus*

В дистильованій воді приготували три десятикратні розведення 5% суміші СЛЖК (C₆ та C₈) (що зберігалася при 7°C). C₆ та C₈ застосовували в рівних вагових кількостях (50/50). Таким чином, 5% суспензія містила 2,5% C₆ та 2,5% C₈. Для отримання бажаних концентрацій 1,5, 0,75 та 0,36мл цих розведень вводили піпеткою в чашки Петрі та обережно змішували з 15мл розплавленого живильного середовища. Для цього використовували середовище Mueller-Hinton II (BBL) з pH7,2.

Законсервовані штами (*Campylobacter jejuni* ATCC 33560 та *Salmonella typhimurium* DAB 76. Два контрольні штами з визначеною антибіограмою, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 та *Escherichia coli* ATCC 25923) вирощували в бульоні Brian Heart. Інокуляти отримали з бульонних культур, вирощених напередодні за 16-26 годин, які інкубували при 37°C. Ці культури отримували шляхом затримки росту в стерильному сольовому розчині у фотометрі, адаптованому для вимірювань за шкалою Мак-Фарленда (bioMerieux). Розчини, що відповідали значенню 0,5 за шкалою Мак-Фарленда, розводили у 10 разів у сольовому

розчині та інокулювали на пластини з СЛЖК та контрольні пластини з використанням інокулятора Denley Multipoint (Mast). У такий спосіб на пластини інокулювали близько 10000 колонієутворюючих одиниць кожного штаму. Усі пластини інкубували при 37°C. Інкубацію виконували в аеробних, в мікро-аеробних (шляхом видалення 80% нормальної атмосфери та введення в судину газової суміші з 8% CO₂, 8% H₂ та 84% N₂) або анаеробних (H₂+CO₂) умовах. Зчитування проводили через 48 годин.

Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) реєстрували як найнижчу концентрацію, яка повністю інгібує ріст бактерій, не враховуючи слабкі ознаки росту одиничних колоній. Результати показані в Таблиці 2.

Таблиця 2

МІК (%) СЛЖК проти патогенів харчового походження *Campylobacter* та *Salmonella*

| | Мікроорганізм | | | |
|---------------------|------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| | <i>E. coli</i> * | <i>E. faecalis</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>C. jejuni</i> |
| Аеробні умови | 0,025 | 0,012 | 0,025 | - |
| Мікро-аеробні умови | 0,025 | 0,012 | 0,025 | 0,0025 |
| Анаеробні умови | 0,025 | 0,005 | 0,025 | <0,0012 |

*Контрольні штами

Випробуваний штам *Campylobacter* взагалі не ріс в аеробних умовах. МІС обох патогенів харчового походження складала від 0,025% до менш ніж 0,0012% СЛЖК. Це означає, що введення специфічних СЛЖК забезпечує сильний інгібуючий ефект на патогени харчового походження, такі як *Campylobacter* та *Salmonella*. Ріст обох штамів несподівано був інгібований, і відповідні мікроорганізми було знищено за допомогою СЛЖК. Це означає, що СЛЖК C₆ та C₈ у застосованих кількостях є особливо корисними для контролю цих типів патогенів харчового походження. *Campylobacter* є у десять разів більш чутливим, ніж *Salmonella*.

Приклад 3: Вплив СЛЖК (C₆-C₈) на свиней, інфікованих *Salmonella*

43 поросят розподілили по трьох групах: СЛЖК (C₆-C₈) (група А, n=16), позитивна контрольна група (група В, n=16) та негативна контрольна група (група С, n=11). Дослідження почали після відлучення від матки та продовжували протягом 42 днів, після чого усіх тварин умертвили. В кожній загорі груп А та В, двох з чотирьох поросят експериментально інокулювали *Salmonella ser. typhimurium* до того, як вмістити їх з двома неінфікованими поросятами. Інокуляцію проводили через три дні після відлучення від матки. Корм із добавкою СЛЖК (C₆ та C₈) (див. корма 1 та 2 нижче) почали давати за три дні до інокуляції й продовжували давати до кінця дослідження. C₆ та C₈ застосовували в рівних вагових кількостях (50/50). Клінічний бал вимірювали двічі на тиждень за допомогою одного й того самого ветеринара. Для цього поросят були присвоєні такі коди:

0= нормальне жваве поросся, що реагує на спостерігача, коли він входить у загорожу, нормальна поведінка, уникає людських рук

1= мляве, уникає людських рук, але відходить лише на коротку відстань, не виявляє багатьох ознак нормальної поведінки, може лежати, коли спостерігач входить у загорожу

2= дуже мляве, потребує підштовхування, щоб пересуватись, здебільшого лежить

Також двічі на тиждень вимірювали фекальний бал за допомогою того самого ветеринара. Для цього поросяткам були присвоєні такі коди:

0= норма

1= м'які фекалії (або консистенції коров'ячого гною)

2= діарея

Крім того, досліджували параметри продуктивності, включаючи середньодобовий приріст (СДП) та поглинання корму (ПК). Коефіцієнт засвоєння корму (КЗК) розраховували для групи в цілому. Нарешті, вимірювали показник смертності.

Спеціальний корм після відлучення від матки розподіляли протягом двох тижнів після відлучення таким чином:

Корм 1: Контрольний корм після відлучення

Корм 2: Контрольний корм після відлучення +0,3% СЛЖК (C₆ та C₈)

Первинний корм розподіляли з 15 дня після відлучення протягом 7 тижнів після відлучення таким чином:

Корм 3: Контрольний первинний корм

Корм 4: Контрольний первинний корм +0,2% СЛЖК (C₆ та C₈)

Поросят годували у довільній кількості (на розсуд дослідника) від їхнього прибуття протягом усього періоду дослідження (= превентивна програма годування).

Інфікування поросят відбувалося таким чином: поросся отримувало 1 мл розчину TSB, який містив $1,9 \times 10^9$ CFU Salmonella ser. Typhimurium, що являв собою польовий штам з Бельгії. Цей розчин розчиняли в 4мл молока і вводили перорально кожного з поросят. Таку дозу вибрали на підставі літературних даних [Wood et al., 1989].

Ця експериментальна методика проілюстрована в Таблиці 3. Випробування було сліпим для складу корму, розподілу корму, реєстрації даних та статистичного аналізу. Таким чином, це було потрібне сліпе рандомізоване випробування. Зоотехнічні показники представлені в Таблиці 4.

Таблиця 3

Розподілення поросят, інфекції та корму на експериментальній фермі

| Батарея* | Група | Корм | | Кількість | | |
|----------|-------|------------------|-----------|---------------------------------------------|--------|--------------------|
| | | після відлучення | первинний | зайнятих загоріж/загальна кількість загоріж | тварин | інфікованих тварин |
| 1 | C | 1 | 3 | 3/4 | 11 | 0 |
| 2 | B | 1 | 3 | 2/4 | 8 | 4 |
| 3 | B | 1 | 3 | 2/4 | 8 | 4 |
| 7 | A | 2 | 4 | 2/4 | 8 | 4 |
| 8 | A | 2 | 4 | 2/4 | 8 | 4 |

* Батарею 4 застосовували для інфікування тварин. Після цього інфікованих тварин вміщували разом з неінфікованими в день 0. Таким чином, у таблиці показано ситуацію в день 0.

Таблиця 4

Зоотехнічні показники поросят у випробуванні з Salmonella

| | | Група А СЛЖК (C ₆ -C ₈) | Група В Позитивний контроль | Група С Негативний контроль |
|------------------------|------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Щоденний ріст (г/день) | Загальна група | 337±188 | 213±115 | 293±148 |
| Засвоєння корму | Загальна група | 1,58 | 1,80 | 1,57 |
| | Неінфіковані пороссята | 18,8 | 25 | 9,1 |
| Смертність (%) | Інфіковані пороссята | 25 | 50 | 0 |
| | Загальна група | 18,8 | 37,5 | 9,1 |

Цей приклад показує, що СЛЖК C₆ та C₈ має вплив на СДП та КЗК. Пороссята в групі СЛЖК (C₆/C₈) мали кількісно вищий СДП, ніж пороссята у позитивній контрольній групі. СДП в групах А, В та С склав 337±188, 213±115 та 293±148г/день, відповідно. Стандартне відхилення є високим через високий показник смертності в різних групах. КЗК був подібним в групах А та С, тоді як засвоєння корму в групі В було вищим. Вищий коефіцієнт засвоєння корму в групі В зумовлений вищим засвоєнням корму у фазі годування після відлучення. Смертність була найнижчою в групі С, тоді як в

групі В смертність була найвищою. Різниця між групою СЛЖК (C₆-C₈) (А) та позитивною контрольною групою (В) була очевидною, зокрема, для інфікованих поросят. Тварини в групі А мали клінічний бал більше 0 у 10,2% випадків. В групі В - у 19,0%, а в групі С - у 1,5% випадків (p>0,05). Середня кількість випадків діареї в групах А, В та С склала 17,9%, 30,0% та 10,0%, відповідно (p>0,05).

Ці результати доводять, що показник смертності може бути знижений шляхом додавання СЛЖК (C₆ та C₈) у корм. Зниження показника смертності після додавання СЛЖК (C₆ та C₈) може бути поясне-

не кращими клінічними та фекальними балами тварин.

СЛЖК (C_6 та C_8) здатні покращувати СДП порсят після інфікування *Salmonella*. Очевидно, це зумовлене кращим клінічним станом та кращим станом шлунково-кишкового тракту, що доводить покращений фекальний бал. Цікаво те, що для тварин, які отримували СЛЖК (C_6 та C_8), було отримано навіть кращий СДП, ніж для тварин негативної контрольної групи. Це може бути пояснене позитивним ефектом на стан ворсинок, що приводить до кращого всмоктування поживних речовин зі шлунково-кишкового тракту.

СЛЖК (C_6 та C_8) повністю відновлює КЗК (коефіцієнт засвоєння корму), який швидко росте після інфікування *Salmonella*. Якщо після інфікування застосовується корм без добавок, клінічний та фізичний стан тварин дуже поганий, що знаходить своє відображення у високому коефіцієнті засвоєння корму. Результати показують, що інфекція *Salmonella* впливає на КЗК лише у фазі годування після відлучення. Це означає, що на початку періоду годування первинним кормом тварина вже є добре відновленою від інфекції *Salmonella*. Це також показує СДП у період годування первинним кормом для позитивної контрольної групи. Тому додання СЛЖК (C_6 та C_8) у період годування первинним кормом не впливає на КЗК.

На основі цих результатів можна зробити висновок, що СЛЖК (C_6 та C_8) становлять дуже ефективну альтернативу прискорювачам росту (антибіотикам) для контролю інфекції *Salmonella* у свиней.

Приклад 4: Вплив різних сумішей СЛЖК на виживання *Salmonella*

В дистильованій воді приготували три десятикратні розведення 10% суспензії чотирьох продуктів:

1. 22,5% C_8 /22,5% C_{10}
2. 45% C_8
3. 22,5% C_6 /22,5% C_8
4. 45% C_6

(що зберігалися перед застосуванням при 7°C).

Для отримання бажаних концентрацій 1,5,0,75 та 0,36мл цих розведень вводили піпеткою в чашки Петрі та обережно змішували з 15мл розплавленого живильного середовища. Для цього використовували середовище "de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium" (Oxoid, CM361) з pH6,2. Штами (*Salmonella* ser. Typhimurium DAB 76 та один дикий штам *Salmonella*, виділений зі свинини, серотип визначено в інституті W.I.V., Брюссель) вирощували у BHI протягом 24 годин в аеробних умовах. Інокуляти готували шляхом розведення культур, вирощених напередодні в бульоні Brian Heart (Oxoid, Basingstoke, UK), в буферизованому сольовому розчині до густини 0,5 за шкалою каламунтності Мак-Фарленда та розводили у 40 разів перед інокуляцією. Пластини засівали приблизно 1×10^5 CFU (колонієутворюючих одиниць) інокулятом Стірса. Контрольні пластини з обома середовищами без продукту інокулювали наприкінці процедури. Всі пластини інкубували при 37°C у придатній атмосфері. Зчитування проводили че-

рез 48 годин. Реєстрували МПС (мінімальну інгібуючу концентрацію), що є найнижчою концентрацією, яка повністю інгібує ріст бактерій, не враховуючи слабкі ознаки росту одиничних колоній. Результати наведені в Таблиці 5. З Таблиці 5 можна зробити висновок, що C_6 , а також суміші C_6/C_8 є ефективними.

Таблиця 5

МПС (%) різних сумішей СЛЖК проти патогенів *Salmonella* харчового походження

| | | Суміш | | | |
|-------------------------------|---------|-------|-------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | DAB 76 | 0,025 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | KN-03-7 | 0,025 | 0,025 | 0,01 | 0,01 |

Приклад 5: Вплив різних сумішей СЛЖК на виживання *E.coli*

В цьому прикладі оцінювали протимікробну активність СЛЖК C_6 та/або C_8 та/або C_{10} по відношенню до *E. coli* K 88. Тестовий розчин готували таким чином: до 1кг корму (композиція Таблиці 6) додавали точно визначену кількість *E. coli* K 88. Після цього готували суспензію 20% корму та 80% фізіологічного розчину (0,85% сольового розчину). Для моделювання 20% суспензії в шлунковому середовищі встановлювали pH4,0 за допомогою 0,1N HCl.

Таблиця 6

Експериментальна кормова композиція

| Сировина | Кількість (г) |
|------------------------------------------|---------------|
| Пшениця | 500 |
| Кукурудза, зварена під тиском | 200 |
| Соеві боби з високим вмістом жирів Danex | 150 |
| Оселедцева мука | 50 |
| Суша сироватка | 70 |
| Премікс | 30 |

Підкислену суспензію розділяли на 100-мл зразки. Тестові речовини додавали у різних концентраціях, як показано в Таблиці 7.

Таблиця 7

Діапазон концентрацій різних тестових речовин

| | Концентрація (%) | | | |
|--------------------------------|------------------|-------|------|------|
| Капронова кислота (C_6) | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,50 |
| Каприлова кислота (C_8) | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,50 |
| Капринова кислота (C_{10}) | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,50 |

При $t=0$ виконували мікробний підрахунок. Зразки інкубували протягом 3 годин при 37°C. Зразки видаляли через 3 години, визначали pH та виконували мікробний підрахунок. Штами *E. coli* підраховували на середовищі Coli ID (Bio Merieux, 42017).

Заплановані спостереження були такі:

а. Мікробний підрахунок контрольного зразка (чистого) при $t=0$

б. Мікробний підрахунок контрольного зразка (чистого) та оброблених зразків при $t=3$ год.

Таблиця 8 містить розраховані результати, що доводять протимікробну ефективність різних СЛЖК у шлунку.

Таблиця 8

Протимікробний ефект C_6 , C_8 та C_{10}

| Тестова печовина | Log (CFU/r) | |
|------------------|-------------------|-------------------|
| | T=0 годин | T=3 години |
| Чистий | 5,293 | 5,449 |
| C_6 0,06% | 5,708 | 4,160 |
| C_6 0,125% | 5,700 | Повне інгібування |
| C_6 0,250% | 4,920 | Повне інгібування |
| C_6 0,500% | Повне інгібування | Повне інгібування |
| C_8 0,06% | 5,649 | Повне інгібування |
| C_8 0,125% | 5,415 | Повне інгібування |
| C_8 0,250% | Повне інгібування | Повне інгібування |
| C_8 0,500% | Повне інгібування | Повне інгібування |
| C_{10} 0,06% | 6,964 | 6,854 |
| C_{10} 0,125% | 6,927 | 6,707 |
| C_{10} 0,250% | 6,966 | 4,708 |
| C_{10} 0,500% | 6,816 | Повне інгібування |

З Таблиці 8 можна зробити висновок, що C_6 , C_8 та C_{10} забезпечують протимікробну дію по відношенню до *E. coli*.

Приклад 6: Ефект C_8 порівняно з C_{10} на зоотехнічні показники свиней

В цьому прикладі досліджували ефект C_8 порівняно з C_{10} на зоотехнічні показники свиней. Застосовували такі корма:

Корм А: негативний контрольний корм без протимікробного прискорювача росту

Корм В: корм А з вмістом 0,125% C_{10}

Корм С: корм А з вмістом 0,125% C_8

Корм D: корм А з вмістом 0,125% суміші C_8/C_{10} (співвідношення 50/50)

Протягом усього випробування свиней годували довільно (на розсуд дослідника). Поросята, що використовувалися у дослідженні, являли собою 200 самців та самиць, відлучених від матки, віком 28 днів на момент відлучення. Поросят відрізняли за вушними бирками та зважували кожного індивідуально. Їх розподілили випадковим чином на різні кормові групи, але середня початкова вага на групу була однаковою. Тварин досліджували протягом 2 тижнів (період первинного годування). Спостерігали за чотирма групами з 50 тварин.

Досліджували такі параметри: поглинання корму в групі, індивідуальна вага поросят та засвоєння корму в групі. Результати наведені в Таблиці 9.

Таблиця 9

Ефект C_8 порівняно з C_{10} на зоотехнічні показники свиней

| | Корм | | | |
|-----------------------------------------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D |
| Щоденне поглинання корму (г/свиню/день) | 566 | 569 | 665 | 603 |
| Щоденний приріст ваги (г/свиню/день) | 309 | 316 | 384 | 336 |
| Засвоєння корму | 1,83 | 1,80 | 1,73 | 1,80 |

В цих експериментах найкращий щоденний приріст, засвоєння корму та поглинання корму були отримані при введенні в корм C_8 . Проте введення в корм однієї C_{10} або у комбінації з C_8 також забезпечувало кращі ефекти, ніж для контрольного корму.

Приклад 7: Ефект СЛЖК на ріст та виживання *Campylobacter* sp. виділеного зі сліпої кишки свійської птиці

В цьому прикладі визначали величини МІК для різних СЛЖК проти *Campylobacter* sp., виділених зі сліпої кишки свійської птиці.

В дистильованій воді приготували три десятикратні розведення 10% суспензії трьох типів СЛЖК (C_6 , C_8 та C_{10}). Для отримання бажаних концентрацій 1,5, 0,75 та 0,36мл цих розведень вводили піпеткою в чашки Петрі та обережно змішували з 15мл розплавленого живильного середовища. Використовували придатне ферментаційне середовище з pH5,0.

Виділені штами *Campylobacter* вирощували в придатному ферментаційному середовищі та інкубували при 37°C у мікро-аеробних умовах шляхом видалення 80% нормальної атмосфери та введення в судину газової суміші з 8% CO_2 , 8% H_2 та 84% N_2 . Інокуляти готували шляхом розведення культур в буферизованому сольовому розчині до густини 0,5 за шкалою каламутності Мак-Фарленда та розводили у 40 разів перед інокуляцією. Пластини засівали інокулятом. Контрольні пластини з середовищами без продукту інокулювали наприкінці процедури. Всі пластини інкубували при 37°C у придатній атмосфері.

Зчитування проводили через 48 годин. Після інкубації підраховували *Campylobacter*.

Результати експериментів з використанням СЛЖК C_{10} показані на Фіг.1-3. Результати експериментів з використанням C_8 показані на Фіг.4-6. Результати експериментів з використанням C_6 показані на Фіг.7-9. На цих фігурах представлено кількість колонієутворюючих одиниць (CFU)/мл штаму *Campylobacter jejuni* VC 5 (Фіг.1, 4, 7), штаму *Campylobacter jejuni* VC 6 (Фіг.2, 5, 8) та штаму *Campylobacter jejuni* VC 7 (Фіг.3, 6, 9) при різних концентраціях СЛЖК та у два різні моменти часу (0 та 180 хвилин).

Результати цих експериментів показують, що СЛЖК C_6 , C_8 та C_{10} при випробуваннях концентраціях виявляють протимікробну активність по відношенню до різних штамів *Campylobacter*. Також виявилось, що в тестових умовах цього дослідження СЛЖК C_{10} показує сильніший протимікробний ефект, ніж C_8 , а C_8 показує більш сильний протимікробний ефект, ніж СЛЖК C_6 , по відношенню до випробуваних штамів *Campylobacter*.

Посилання:

BARTON, M.D. (1998). Does the use of antibiotics in animals affect human health. Aust. Vet. J., 76, 177.

CORRY, J.E.L. and ATABAY, H.I. (2001). Poultry as source of *Campylobacter* and related organisms. J. Appl. Microbiol., 90, 96S-114S.

DUPONT, H.L. and STEELE, J.H. (1987). Use of antimicrobial agents in feeds: implications for human health. Rev. Infect. Dis., 9, 447.

FRIEDMAN, C.R., NEIMANN, J., WEGENER, C. and TAUXE, R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: NACHAMKIN, I. and BLASER, M.J. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 121-138.

GUILLOT, J.F. (1989). Apparition et evolution de la resistance bacterienne aux antibiotiques. *Ann. Rech. Vet.*, 20, 3.

KABARA, J. (1978). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents - a review. In: KABARA, J. (ed.). *The pharmaceutical effects of lipids*, AOCS, Champaign, 111, USA, 1.

NACHAMKIN, I., ALLOS, B.M. and HO, T. (1998). *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 555-567.

NEWELL, D.G. and NACHAMKIN, I. (1992). Immune responses directed against *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. and TOMPKINS, L.S. (eds.). *Current status and future trends*. Washington, American Society for Microbiology, 201-206.

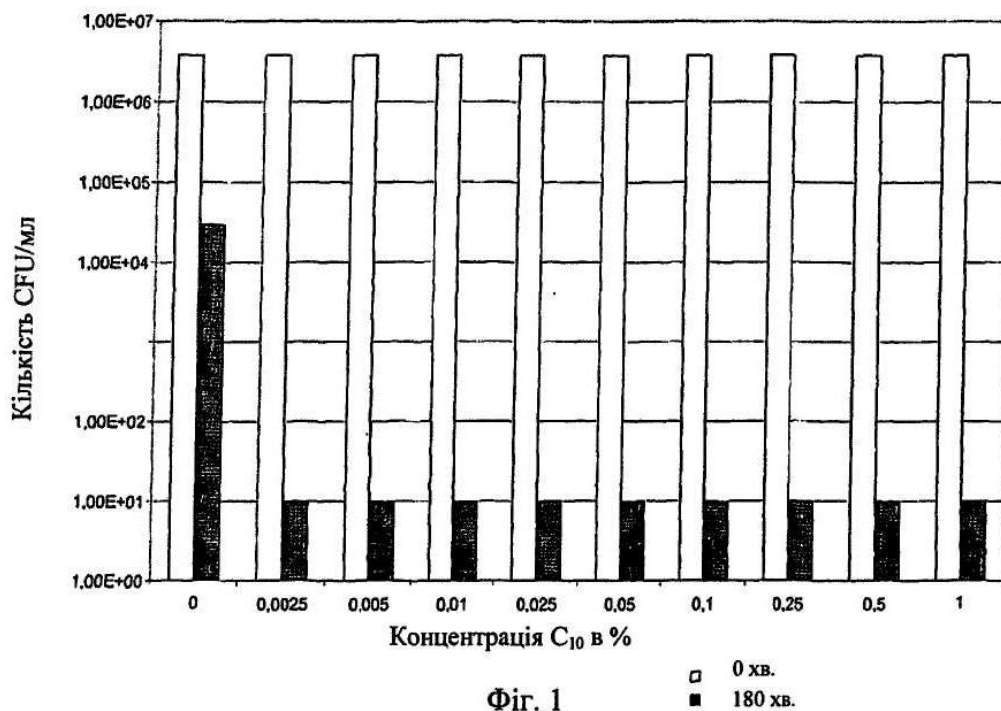
NEWELL, D.G. and WAGENAAR, J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In: NACHAMKIN, I. and BLASER, M.J. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 497-509.

OBERHELMAN, R.A. and TAYLOR, D.N. (2000). *Campylobacter* infections in developing countries. In: NACHAMKIN, I. and BLASER, M.J. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 139-153.

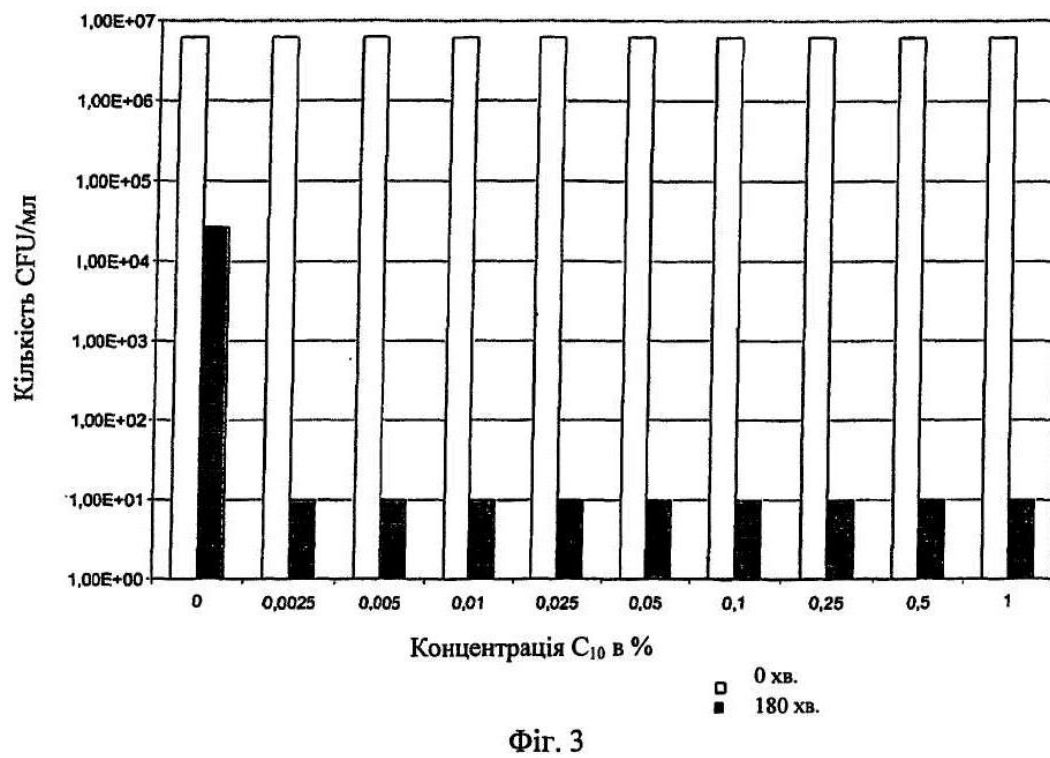
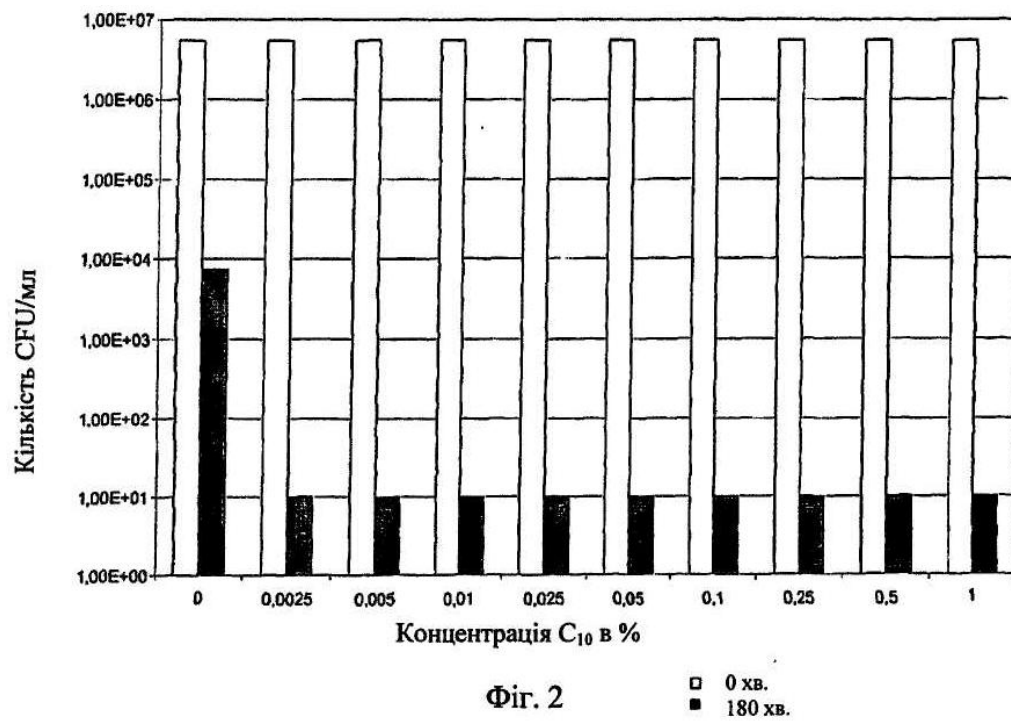
PRESCOTT, J.F. (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food. *Can. Vet. J.*, 38, 763.

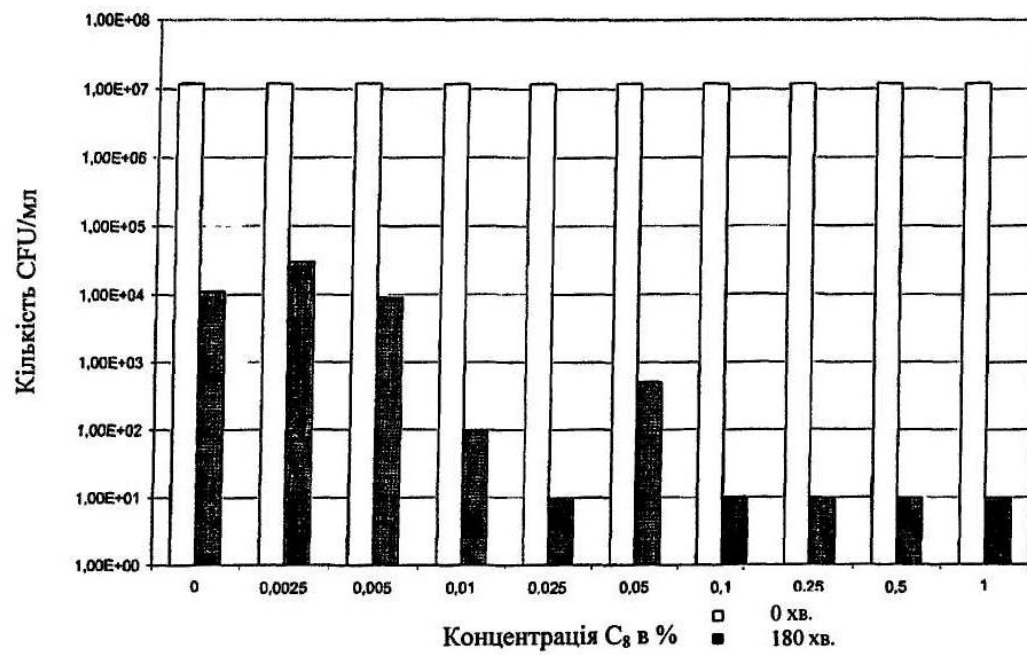
SCOTT, D.A., BAQAR, S., PAZZAGLIA, G., GUERRY, P. and BURR, D.H. (1997). Vaccines against *Campylobacter jejuni*. In: LEVINE, M.M., WOODROW, G.C., KAPER, J.B. and COBON, G.S. (eds.). *New generation vaccines*. New York, Marcel Dekker Inc., 885-896.

WOOD, R.L., POSPISCHIL, A. and ROSE, R. (1989). Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 1015-1021.

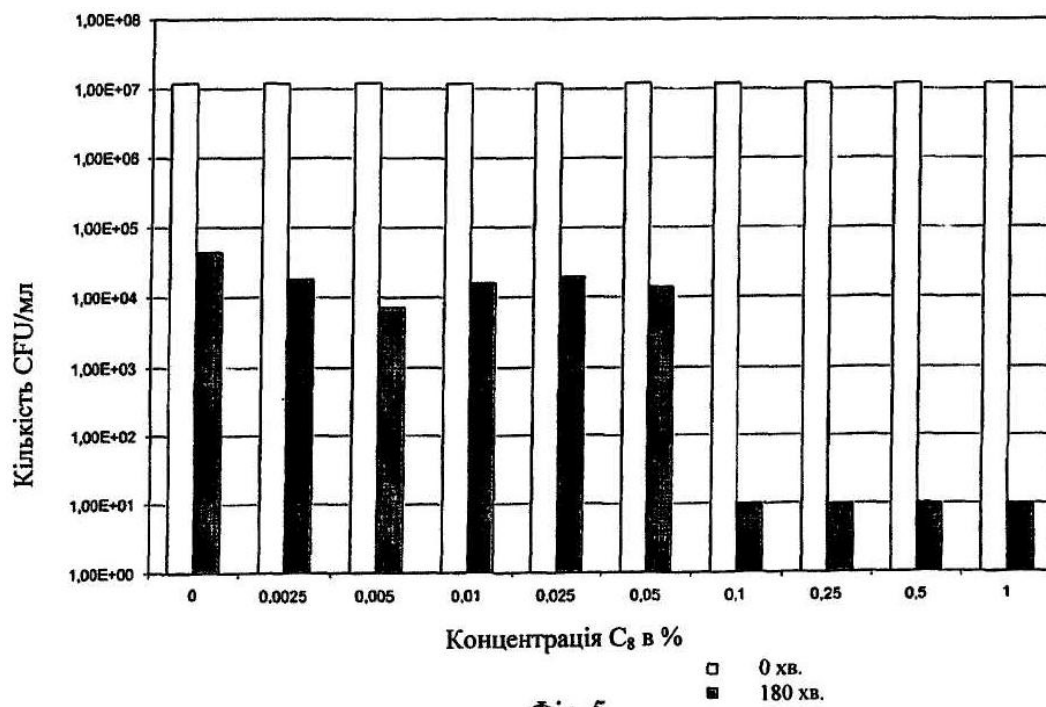


Фиг. 1

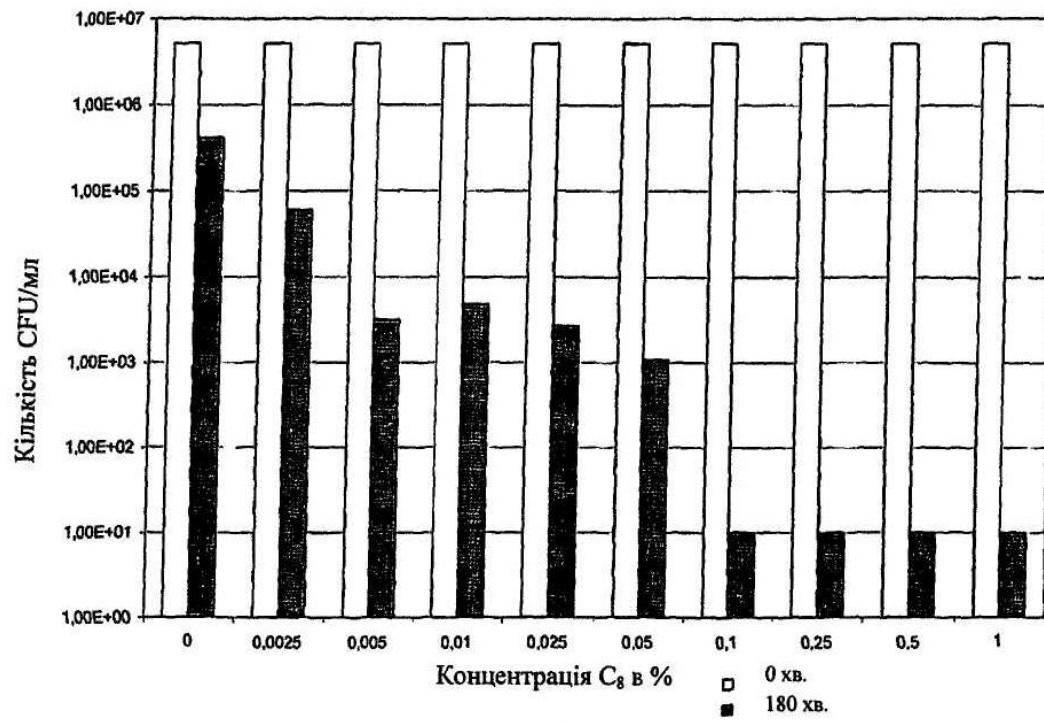




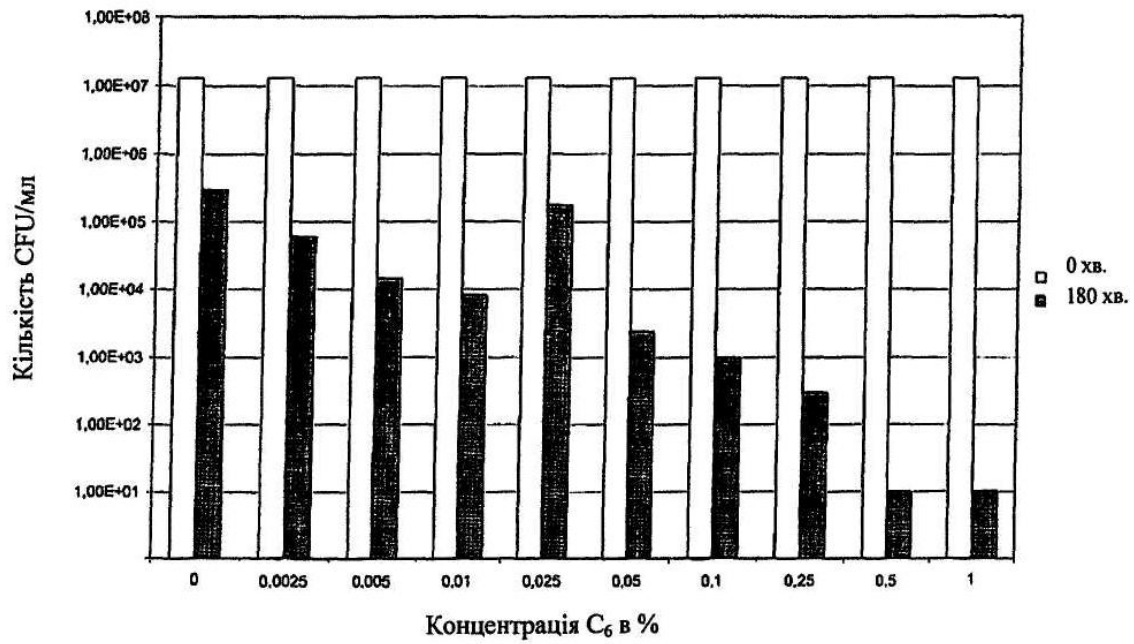
Фіг. 4



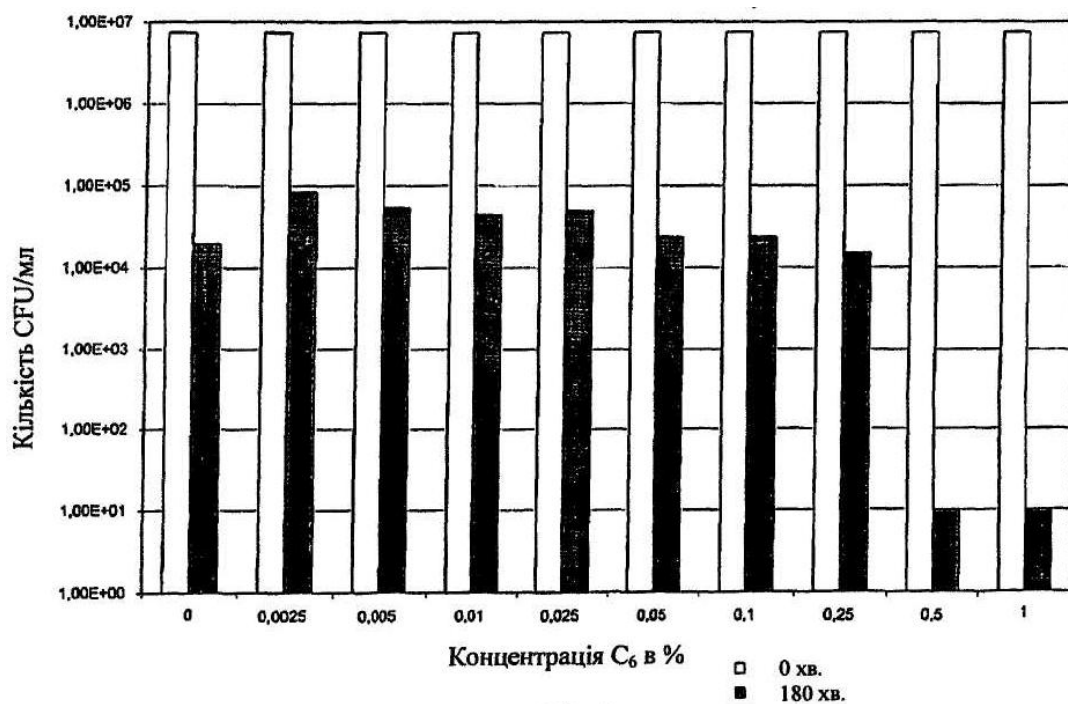
Фіг. 5



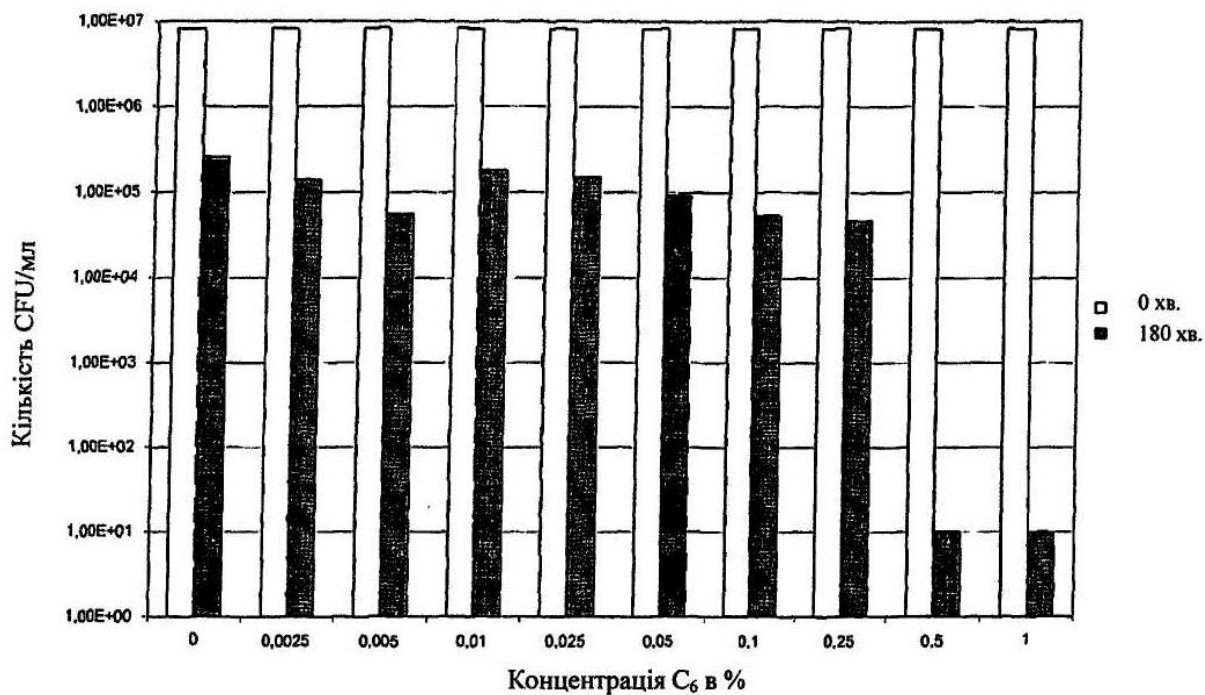
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9