

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048229**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.11
- (21) Номер заявки
202190739
- (22) Дата подачи заявки
2019.09.11
- (51) Int. Cl. *A23K 20/189* (2016.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **КОРМОВАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ МИКРОБНУЮ МУРАМИДАЗУ, ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ПОРАЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ ПОДОДЕРМАТИТОМ**

- (31) **18193726.9**
- (32) **2018.09.11**
- (33) **EP**
- (43) **2021.06.15**
- (86) **PCT/EP2019/074219**
- (87) **WO 2020/053271 2020.03.19**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДСМ АйПи АССТЕС Б.В. (NL);
НОВОЗАЙМС А/С (DK)**
- (72) Изобретатель:
**Кардосо Битгенкорт Летисия, Лопес-
Улибарри Руаль, Перес Кальво
Эстефания, Рубио Гарсия Мария
Элена (CH)**
- (74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)
- (56) WO-A1-2017001701
WO-A1-2017000922
WO-A1-2004026334
WO-A1-2017207372

-
- (57) Изобретение относится к способу повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододрематитом у животных с однокамерным желудком, включающему введение животному композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз.

B1

048229

048229

B1

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка содержит "Перечень последовательностей" в машиночитаемой форме, который включается в настоящий документ путем отсылки.

Уровень техники

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к способам повышения качества навоза/помета и/или снижения пораженности пододерматитом у животных, включающим использование одной или двух микробных мурамидаз.

Предшествующий уровень техники

Мурамидаза, называемая также лизоцимом, имеется у многих организмов, служа для защиты от бактерий. Этот фермент является О-гликозилгидролазой и расщепляет гликозидные связи в пептидогликанах, составляющих важный структурный компонент клеточной стенки бактерий, в результате чего та теряет целостность и бактериальные клетки претерпевают лизис из-за осмотического дисбаланса.

В природе мурамидаза присутствует во многих организмах, например, в вирусах, растениях, у насекомых, птиц, пресмыкающихся и млекопитающих. Мурамидазы относят к пяти различным семействам гликозид-гидролаз (GH) (см классификацию на сайте CAZy; www.cazy.org): группа мурамидазы белка куриного яйца (GH22), группа мурамидазы белка гусиного яйца (GH23), группа мурамидазы бактериофага T4 (GH24), группа белка жгутика бактерий рода *Sphingomonas* (GH73) и группа мурамидазы гриба *Chalaropsis* (GH25). Мурамидазы, относящиеся к семействам GH23 и GH24 известны в основном у бактериофагов и лишь недавно были обнаружены у грибов. Мурамидазы семейства GH25, как выяснилось, структурно не родственны другим семействам мурамидаз.

Традиционный источник мурамидазы - белок куриного яйца, где его сравнительно много. В силу своей доступности мурамидаза белка куриного яйца была до последнего времени единственным таким ферментом, изучавшимся применительно к кормам для животных. В продаже имеется в основном именно эта мурамидаза, но она не расщепляет N,6-О-диацетилмурамовую кислоту, присутствующую, например, в клеточной стенке *Staphylococcus aureus*, так что не способна вызывать лизис этих важных патогенных для человека бактерий (Masschalck B., Deckers D., Michiels C.W. (2002), "Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by muramidase under atmospheric and high hydrostatic pressure", *J. Food Prot.* 65(12):1916-23).

В публикации WO2000/21381 описывается композиция, содержащая по меньшей мере два фермента, обладающих противомикробным эффектом, и полиненасыщенную жирную кислоту: один из этих ферментов является мурамидазой GH22 из белка куриного яйца. В патенте Великобритании GB2379166 описывается композиция, содержащая вещество, разрушающее у бактерий пептидогликановый слой, и вещество, разрушающее у них фосфолипидный слой; то вещество, которое разрушает пептидогликаны, представляло собой мурамидазу GH22 из белка куриного яйца.

В публикации WO2004/026334 описывается композиция с противомикробным действием для подавления размножения патогенной микрофлоры в кишечнике у домашних животных, содержащая: (a) вещество, повреждающее клеточную стенку бактерий, вызывая их лизис, или его соль, b) вещество, обладающее противомикробным эффектом, (c) комплексобразующее соединение, связывающее ионы металлов, и (d) антибиотик; вещество, разрушающее клеточную стенку бактерий, или его соль представляет собой мурамидазу GH22 из белка куриного яйца.

Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мурамидазы можно использовать применительно к кормам для домашних животных с однокамерным желудком, чтобы повысить качество навоза/помета и/или снизить пораженность животных пододерматитом. Поскольку потребность в животном белке возрастает, такое улучшение здоровья скота ценно для сельского хозяйства.

Раскрытие изобретения

Соответственно сказанному выше настоящим изобретением предлагается способ улучшения качества навоза/помета и снижения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, включающий введение этим животным композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 - зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 дикого типа из *Acremonium alcalophilum* с пептидом SPIRR на N-конце, как описано в публикации WO 2013/076253.

SEQ ID NO: 2 - нуклеотидная последовательность, кодирующая мурамидазу GH24, выделенная из *Trichophaea saccata*.

SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность, соответствующая SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 - зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 дикого типа из *Trichophaea saccata*.

SEQ ID NO: 5 - зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH22 дикого типа из *Gallus gallus* (мурамидаза белка куриного яйца).

SEQ ID NO: 6 - праймер F-80470.

SEQ ID NO: 7 - праймер R-80470.

SEQ ID NO: 8 - праймер 8643.

SEQ ID NO: 9 - праймер 8654.

SEQ ID NO: 10 - зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 дикого типа из *Acronium alcalophilum*, как описано в публикации WO 2013/076253.

Определения

Микробная мурамидаза. Термин "микробная мурамидаза" означает полипептид, обладающий мурамидазной активностью, который получен или может быть получен из микробного источника. Примером такого источника являются грибы; то есть данный термин означает, в частности, мурамидазу, которая получена или может быть получена из представителя царства грибов (здесь "царство" - таксономический ранг). В частности, микробная мурамидаза может быть получена из представителей типа *Ascomycota*, например подтипа *Pezizomycotina* (здесь "тип" и "подтип" - таксономические ранги).

Если таксономический ранг источника полипептида неизвестен, специалист в данной области техники может легко определить его, проведя поиск данного полипептида в базах данных с помощью программы BLASTP (например, используя сайт Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сравнивая данный полипептид с ближайшими гомологами. Неизвестный полипептид, который является фрагментом известного полипептида, рассматривается как тот же самый таксономический вид. Неизвестный природный полипептид или искусственный вариант, содержащий замены, делеции и/или вставки не более чем в 10 положениях аминокислотной последовательности, считается относящимся к тому же таксономическому виду живых организмов, что и данный полипептид.

Мурамидазная активность. Термин "мурамидазная активность" означает ферментативную активность, состоящую в катализе гидролиза 1,4- β -связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина в молекулах пептидогликанов или между остатками N-ацетил-D-глюкозамина в циклодекстринах, что приводит к лизису бактериальных клеток из-за осмотического дисбаланса. По Международной классификации ферментов мурамидаза принадлежит к классу EC 3.2.1.17. Мурамидазную активность определяют обычно турбидиметрическим методом.

Этот метод основан на изменении мутности суспензии *Micrococcus luteus* ATCC 4698, вызванном литическим действием добавленной в культуральную среду мурамидазы. В определенных условиях это изменение пропорционально количеству мурамидазы в среде (см. ENS 1105 в Combined Compendium of Food Additive Specifications of the Food and Agriculture Organisation of the UN (www.fao.org)). В данном изобретении мурамидазная активность определяется турбидиметрическим методом анализа, описанным в примере 5 настоящего документа ("Определение мурамидазной активности"). В одном из вариантов воплощения данного изобретения предлагаемые полипептиды обладают мурамидазной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от мурамидазной активности полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов воплощения данного изобретения предлагаемые полипептиды обладают мурамидазной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от мурамидазной активности полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов воплощения данного изобретения предлагаемые полипептиды обладают мурамидазной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от мурамидазной активности полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Фрагмент. Термин "фрагмент" в настоящем документе означает полипептид или каталитический домен, обладающий мурамидазной активностью, в котором отсутствуют один или более (например, несколько) аминокислотных остатков с N- или C-конца по сравнению с аминокислотной последовательностью зрелого полипептида или домена. В одном из вариантов воплощения данного изобретения фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 175 аминокислотных остатков, по меньшей мере 177 аминокислотных остатков, по меньшей мере 180 аминокислотных остатков, по меньшей мере 185 аминокислотных остатков, по меньшей мере 190 аминокислотных остатков, по меньшей мере 195 аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 аминокислотных остатков из последовательности SEQ ID NO: 1 и обладает мурамидазной активностью.

В другом варианте воплощения данного изобретения фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 215 аминокислотных остатков, по меньшей мере 220 аминокислотных остатков, по меньшей мере 225 аминокислотных остатков, по меньшей мере 230 аминокислотных остатков, по меньшей мере 235 аминокислотных остатков или по меньшей мере 240 аминокислотных остатков из последовательности SEQ ID NO: 4 и обладает мурамидазной активностью.

В одном из вариантов воплощения данного изобретения фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 175 аминокислотных остатков, по меньшей мере

177 аминокислотных остатков, по меньшей мере 180 аминокислотных остатков, по меньшей мере 185 аминокислотных остатков, по меньшей мере 190 аминокислотных остатков, по меньшей мере 195 аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 аминокислотных остатков из последовательности SEQ ID NO: 10 и обладает мурамидазной активностью.

Изолированный/выделенный. Термин "изолированный/выделенный" в настоящем документе означает, что данное вещество находится в таком окружении, в каком оно не бывает в природе. Примеры изолированных/выделенных веществ включают (не ограничиваясь перечисленным здесь): (1) любое не встречающееся в природе вещество; (2) любое вещество из числа (не ограничиваясь перечисленным здесь) ферментов, вариантов полинуклеотидов/нуклеиновых кислот, белков, пептидов или кофакторов, которые по меньшей мере частично отделены от одного или более, или всех других субстанций, сопутствующих данному веществу в природе; (3) любое вещество, модифицированное человеком по сравнению с тем, каким это вещество является в природе; (4) любое вещество, содержание которого увеличено по сравнению с другими субстанциями, сопутствующими данному веществу в природе (например, наличие множества копий гена, кодирующего данное вещество; использование промотора, более мощного, чем природный промотор, ассоциированный с геном, кодирующим данное вещество). Изолированное/выделенное вещество может присутствовать в образце ферментационной среды.

Зрелый полипептид. Термин "зрелый полипептид" означает, что полипептид имеет свою окончательную форму после трансляции и всех посттрансляционных модификаций, например изменения или укорочения N- или C-концевого участка, гликозилирования, фосфорилирования и прочего.

Идентичность последовательностей. Родство двух аминокислотных или нуклеотидных последовательностей описывается показателем "идентичность/степень идентичности последовательностей".

В данном изобретении идентичность двух аминокислотных последовательностей определяется с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно в версии 5.0.0 или более поздней. При этом берутся следующие параметры: штраф за внесение пропуска 10, штраф за продолжение пропуска 0,5 - и используется матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Величина "longest identity", (наиболее длинный участок идентичности) в выходных данных программы NEEDLE принимается за степень идентичности (в процентах) и рассчитывается следующим образом:

$$\left(\frac{\text{число совпадающих аминокислотных остатков} \times 100}{\text{длина выравнивания} - \text{суммарное количество пропусков в выравнивании}} \right)$$

Вариант. Термин "вариант" в настоящем документе означает полипептид, обладающий мурамидазной активностью, в котором имеется изменение (замена, вставка и/или делеция) одного или более (нескольких) аминокислотных остатков в одном или более (например, нескольких) положениях полипептидной цепи. Замена означает, что вместо одного аминокислотного остатка в том же положении последовательности находится другой аминокислотный остаток; делеция означает отсутствие аминокислотного остатка в данном положении; вставка (инсерция) означает добавление 1, 2 или 3 аминокислотных остатков перед или сразу после данного положения.

В одном из воплощений данного изобретения вариант мурамидазы содержит от 1 до 5; от 1 до 10; от 1 до 15; от 1 до 20; от 1 до 25; от 1 до 30; от 1 до 35; от 1 до 40; от 1 до 45 или от 1-50, то есть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 изменений и обладает мурамидазной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от мурамидазной активности исходного фермента, например имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10.

Животное с однокамерным желудком. Термин "животное с однокамерным желудком" относится к любому животному, у которого желудок представляет собой единый объем (одну камеру); в настоящем документе человек к ним не относится. Примеры животных с однокамерным желудком включают свиней (в том числе, но не только, поросят-сосунов, поросят-отъемышей и свиноматок); домашнюю птицу, например домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей (включая скворцов) и кур (включая, но не только, бройлеров, цыплят, куриц-несушек, куриц-молодок); домашних питомцев, например кошек и собак; лошадей (включая, но не только, породы горячих кровей, породы холодных кровей и "тепловыводящие" породы), ракообразных (в том числе, но не только, пильчатых и настоящих креветок) и рыб (в том числе, но не только, желтохвостов, арапайм, барбусов, каменных окуней, луфарей, прохилодусов, лещей, бычков и лисичек, бурого паку, карпов, сомов и зубаток, катли, молочную рыбу, гольцов, цихлид, кобий, треску и других тресковых, краппи, корифен, горбылей, угрей, пескаррей, карасей, гурами, гарруп и груперов, парохромисов, палтусов, камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов, макрель, ханосов, лактаров, герресов, махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пиранийевых, цейлонского этроплюса, аргентинскую атерину (одонтеста), терапон, баррамунди и других окуневых, щук, трахинот и помпан, плотву, лососевых, судаков (в том числе светлоперого), длинноусого гетеробранха, вареху, нотрописов и масляную рыбу, головешек, змееголовов,

луцианов, робал, камбал, пестряков, осетров, солнечных, линей, акар, тилапий, форелей, тунцов, палтусов, ряпушку, сига.

Корм для животных. Термин "корм/пища для животных" в настоящем документе относится к любому веществу, продукту или смеси, пригодной или предназначенной для потребления животным. Корм для животных с однокамерным желудком представляет собой, как правило, комбикорм (комбинированный корм) включающий, например, смесь зернового сырья и продуктов с высоким содержанием белка (например, концентратов), а также витамины, минеральные вещества, ферменты, пробиотики, аминокислоты и/или другие пищевые ингредиенты (как, например, в премиксах). Корм для жвачных животных представляет собой, как правило, комбикорм, включающий фураж (в том числе грубые корма или силос), концентраты, а также витамины, минеральные вещества, ферменты, пробиотики, аминокислоты и/или другие пищевые ингредиенты (как, например, в премиксах).

Концентрат. Термин "концентрат" означает высококалорийный кормовой продукт с большим содержанием белка и энергии, например рыбную муку, мелассу, олигосахариды, сорго, зерно и семена (цельные или обработанные путем дробления, помола и др.) кукурузы, овса, ржи, ячменя, пшеницы, прессованный жмых масличных культур (например, хлопка, подсолнечника, сафлора, сои, например соевый шрот, рапса, в том числе канадских сортов с пониженным содержанием эруковой кислоты, арахиса или земляного ореха), кокосовый жмых, дрожжевой экстракт и другие дрожжевые продукты, влажная зерновая барда (WDS) и сухая зерновая барда с гидролизатами (DDGS)).

Фураж. Термин "фураж" в настоящем документе включает также грубый корм. Фураж - это необработанный растительный материал, свежий или сохраненный, например сено и силос из кормовых трав и других растений, водоросли, проросшее зерно и плоды бобовых растений или любые их сочетания. Примерами кормовых растений являются люцерна, лядвенец рогатый, крестоцветные (например, кормовая капуста, рапс/канола, брюква, турнепс), клевер (например, шведский, красный, подземный, белый), различные травы (например, свиной пальчатый, костер, райграсс высокий, овсяница, трехзубка, мятлик, ежа сборная, плевел, тимофеевка), кукуруза, просо, ячмень, овес, рожь, сорго, соя и пшеница, а также овощные растения, например свекла. Фураж также включает тот материал, который остается от сельскохозяйственных культур после получения зерна/семян (например, кукурузная солома с початками, солома пшеницы, ячменя, овса, ржи и других злаков); остатки от переработки овощных культур, например свекловичная ботва; отходы переработки масличных культур, например стебли и листья сои и других бобовых, рапса; отходы очистки зерна для потребления человеком и животными, или для производства топлива, или иных промышленных целей.

Грубый корм. Термин "грубый корм" означает сухой растительный материал, содержащий много волокон, например древесные и пищевые волокна; отруби, шелуха, лузга и кожура семян и плодов, остатки растений (солома, копра, початки кукурузы без зерен, полова, отходы производства свекловичного сахара).

Качество навоза/помета. Термин "качество навоза/помета" означает состав и состояние продуктов жизнедеятельности и содержания животных. Помет представляет собой смесь подстилки, экскрементов, перьев, остатков корма и питья. Качество навоза/помета характеризуется влажностью, рН, содержанием аммиачного азота и др.

Осуществление изобретения

Способы повышения качества навоза/помета и/или снижения пораженности пододерматитом.

Было неожиданно обнаружено, что добавление в корм для животных микробной мурамидазы приводит к значительному повышению качества навоза/помета от животных с однокамерным желудком по сравнению с кормом без этого фермента. Испытания *in vivo* на домашней птице (цыплятах-бройлерах) показало, что:

(a) обработка корма мурамидазой приводит к уменьшению влажности помета;

(b) обработка корма мурамидазой приводит к уменьшению содержания аммиачного азота в помете и/или

(d) обработка корма мурамидазой приводит к снижению уровня рН помета.

Было также обнаружено, что добавление в корм для животных микробной мурамидазы приводит к снижению пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком по сравнению с кормом без этого фермента. Испытания *in vivo* на бройлерах показало, что:

(a) обработке корма мурамидазой меньше пораженности птицы пододерматитом.

Таким образом, данное изобретение относится к способу повышения качества навоза/помета и/или снижению пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком путем введения животным композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз.

По данному изобретению для оценки изменения пораженности пододерматитом и качества помета сравнивают соответствующие признаки в случае корма или кормовой добавки, содержащих мурамидазу, и в случае корма или кормовой добавки, не содержащих этого фермента (далее в настоящем документе такой корм называется отрицательным контролем).

Предпочтительно влажность помета снижается на по меньшей мере 1%, например по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2,0%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере

на 3,5%, по меньшей мере на 4% или по меньшей мере на 5% по сравнению с отрицательным контролем.

Предпочтительно содержание аммиачного азота в помете снижается по меньшей мере на 10%, например по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 25% или по меньшей мере на 30% по сравнению с отрицательным контролем.

Предпочтительно рН помета снижается на 0,05-0,2, например на 0,075-0,175; 0,1-0,15, по сравнению с отрицательным контролем.

Предпочтительно пораженность пододерматитом уменьшается на 5-30%, например на 10- 25%, на 15- 20%, по сравнению с отрицательным контролем.

По данному изобретению микробная мурамидаза добавляется в корм для животных в количестве 100-1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например, 200-900 мг, 300-800 мг, 400-700 мг, 500-600 мг фермента на 1 кг корма или в любых значениях в указанных интервалах.

По данному изобретению животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, домашней птицы, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, цыплят, куриц-несушек, куриц-молодок, кошек, собак, лошадей, ракообразных, пильчатых и настоящих креветок, рыб, желтохвостов, арапайм, барбусов, каменных окуней, луфарей, прохилодусов, лещей, бычков и лисичек, бурого паку, карпов, сомов и зубаток, катли, молочную рыбу, гольцов, цихлид, кобий, треску и других тресковых, краппи, корифен, горбылей, угрей, пескарей, карасей, гурами, гарруп и групперов, парахромисов, палтусов, камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов, макрель, ханосов, лактаров, герресов, махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пираньевых, цейлонского этроплюса, аргентинскую атерину (одонтеста), терапон, баррамунди и других окуневых, шук, трахинот и помпан, плотву, лососевых, судаков (в том числе светлоперого), длинноусого гетеробранха, вареху, нотрописов и масляную рыбу, головешек, змееголовов, луцианов, робал, камбал, пестряков, осетров, солнечников, линей, акар, тилапий, форелей, тунцов, палтусов, ряпушку, сигов. Предпочтительно животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, домашней птицы, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, цыплят, куриц-несушек, кур-молодок. Более предпочтительно животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, цыплят и куриц-несушек.

По данному изобретению микробную мурамидазу можно давать животному с кормом начиная с рождения и вплоть до забоя. Предпочтительно микробную мурамидазу дают животному ежедневно начиная с рождения и вплоть до забоя. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу животному ежедневно в течение по меньшей мере 10 суток, например в течение по меньшей мере 15 суток или по меньшей мере 20 суток (эта продолжительность может быть непрерывной или с перерывами) на протяжении его жизни. Также предпочтительно давать микробную мурамидазу животному в течение 10-20 суток, после чего делать перерыв на 5-10 суток и повторять этот цикл на протяжении всей жизни особи.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают бройлерам в течение первых 49 суток после вылупления. Предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам в течение первых 36 суток после вылупления. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу бройлерам в период с 22-х по 36-е сутки после вылупления. Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу бройлерам в предстартовый период (с 1-х по 7-е сутки). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу бройлерам в стартовый период (с 8-х по 22-е сутки). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу бройлерам в предстартовый период (с 1-х по 7-е сутки) и в стартовый период (с 8-х по 22-е сутки).

По данному изобретению микробную мурамидазу дают курицам-несушкам в течение всей жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают курицам-несушкам в течение 76 недель начиная с момента вылупления птицы. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу курицам-несушкам в период яйценоскости (начиная с 18-й недели). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу курицам-несушкам в течение периода яйценоскости, но делать перерывы на период принудительной линьки.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают домашним индейкам в течение всей жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают домашним индейкам в течение 24 недель начиная с момента вылупления птицы. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу индюшкам в течение 16 недель начиная с момента вылупления, индюкам - в течение 20 недель.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают свиньям на протяжении всей жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают свиньям в течение 27 недель начиная с момента рождения. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу пороссятам начиная с момента рождения и до отъема от свиноматки (в возрасте 4 недель). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу пороссятам в течение 6 недель начиная с момента рождения (4 недели молочного вскармливания и 2 недели после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу пороссятам-отъемышам в течение предстартового периода (с 1-х по 14-е сутки после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу пороссятам-отъемышам в течение стартового периода (с 15-х по 42-е сутки после

отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу пороссятам-отъемышам в течение предстартового периода (с 1-х по 14-е сутки после отъема) и стартового периода (с 15-х по 42-е сутки после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу свиньям в течение периода роста/откорма (с 10-й по 27-ю неделю после рождения).

По данному изобретению источником микробной мурамидазы могут быть грибы. Предпочтительно микробную мурамидазу получают (или ее возможно получить) из грибов типа Ascomycota, например из представителей подтипа Pezizomycotina. Микробная мурамидаза по данному изобретению предпочтительно содержит домен, выбираемый из группы, состоящей из доменов семейств GH24 и GH25.

По данному изобретению микробная мурамидаза по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10.

По данному изобретению микробная мурамидаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее аллельный вариант либо состоит из указанных последовательностей, или же является их фрагмент, обладающим мурамидазной активностью, который содержит по меньшей мере 170 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 175 аминокислотных остатков, по меньшей мере 177 аминокислотных остатков, по меньшей мере 180 аминокислотных остатков, по меньшей мере 185 аминокислотных остатков, по меньшей мере 190 аминокислотных остатков, по меньшей мере 195 аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 аминокислотных остатков. Микробная мурамидаза по данному изобретению предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее аллельный вариант (либо состоит из указанных последовательностей) и полигистидиновую (His-tag) и/или гистидин-глутаминовую (HQ-tag) последовательность на N- и/или C-конце. Более предпочтительно, чтобы этот полипептид содержал аминокислотные остатки с 1-го по 213-й последовательности SEQ ID NO: 1 или состоял из них.

Или же микробная мурамидаза по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. или ее аллельный вариант либо состоит из указанных последовательностей, или же является их фрагментом, обладающим мурамидазной активностью, который содержит по меньшей мере 210 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 215 аминокислотных остатков, по меньшей мере 220 аминокислотных остатков, по меньшей мере 225 аминокислотных остатков, по меньшей мере 230 аминокислотных остатков, по меньшей мере 235 аминокислотных остатков или по меньшей мере 240 аминокислотных остатков. Микробная мурамидаза по данному изобретению предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее аллельный вариант (либо состоит из указанных последовательностей) и полигистидиновую (His-tag) и/или гистидин-глутаминовую (HQ-tag) последовательность на N- и/или C-конце. Более предпочтительно, чтобы этот полипептид содержал аминокислотные остатки с 1-го по 245-й последовательности SEQ ID NO: 4 или состоял из них.

Или же микробная мурамидаза по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. или ее аллельный вариант либо состоит из указанных последовательностей, или же является их фрагментом, обладающим мурамидазной активностью, который содержит по меньшей мере 210 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 215 аминокислотных остатков, по меньшей мере 220 аминокислотных остатков, по меньшей мере 225 аминокислотных остатков, по меньшей мере 230 аминокислотных остатков, по меньшей мере 235 аминокислотных остатков или по меньшей мере 240 аминокислотных остатков. Микробная мурамидаза по данному изобретению предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или ее аллельный вариант (либо состоит из указанных последовательностей) и полигистидиновую (His-tag) и/или гистидин-глутаминовую (HQ-tag) последовательность на N- и/или C-конце. Более предпочтительно, чтобы этот полипептид содержал аминокислотные остатки с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 10 или состоял из них.

Микробная мурамидаза по данному изобретению может быть вариант последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10, обладающим мурамидазной активностью и содержащим одну или более аминокислотных замен, и/или одну или более делеций, и/или одну или более вставок, или любых комбинаций указанных изменений в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положения полипептидной цепи. Предпочтительно те положения, в которых один или более аминокислотных остатков заменены, и/или отсутствуют, и/или вставлены, или имеется любая комбинация указанных изменений последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10, находятся между 1-м и 45-м положениями, например в участках 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 или 1-5. Более предпочтительно, чтобы количество положений, в которых один или более аминокислотных остатков заменены, и/или отсутствуют, и/или вставлены, или имеется любая комбинация указанных изменений последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10 не превышало 10, например составляло 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Еще более предпочтительно, чтобы количест-

во аминокислотных замен, делеций и/или вставок в последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10 не превышало 10, например составляло 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Еще более предпочтительно, чтобы количество аминокислотных замен, предпочтительно консервативных замен, в последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10 не превышало 10, например составляло 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Еще более предпочтительно, чтобы количество консервативных аминокислотных замен в последовательности SEQ ID NO: 1, 4 или 10 не превышало 10, например составляло 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Всякому специалисту в данной области техники понятно, что в полипептидной цепи микробной мурамидазы возможно множество изменений аминокислотной последовательности. Эти изменения могут быть незначительными, например консервативные замены аминокислотных остатков или вставки, не влияющие существенно на сворачивание полипептидной цепи и/или активность белка; небольшие делеции (от одного аминокислотного остатка до 30); небольшое удлинение полипептидной цепи на С- или N-конце, например появление остатка метионина на N-конце; короткие пептидные линкеры длиной до 20-25 аминокислотных остатков; или небольшое наращивание полипептидной цепи с изменением электрического заряда или иного свойства белка, облегчающее его очистку, например полигистидиновая последовательность, антигенная детерминанта (эпитоп) или связывающий домен.

Примеры консервативных замен - это замены одного аминокислотного остатка на другой, относящийся к той же группе по свойствам, что и исходный; аминокислоты разделяются по свойствам на следующие группы: основные (аргинин, лизин и гистидин), кислотные (глутаминовая и аспарагиновая кислоты), полярные (глутамин и аспарагин), гидрофобные (лейцин, изолейцин и валин), ароматические (фенилаланин, триптофан и тирозин) и аминокислоты небольшого молекулярного размера (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Аминокислотные замены, не влияющие, как правило, на специфическую активность белка, известны в данной области техники и описаны, например, в работе Н. Neurath, R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York. Обычными консервативными заменами являются, например, замены Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly.

Имеющиеся в полипептидной цепи остатки критически важных аминокислот можно выявить и идентифицировать известными в данной области техники методами, например, путем сайт-направленного мутагенеза или сканирующего мутагенеза с использованием аланина (Cunningham B.C., Wells J.A., 1989, *Science* 244: 1081-1085). Этот метод состоит в том, что каждый аминокислотный остаток полипептидной цепи по очереди заменяют на аланин и каждую такую мутантную белковую молекулу проверяют на активность (в данном случае - на мурамидазную активность), что позволяет выявить, какие аминокислотные остатки критически важны для активности белка; см. также работу Hilton D.J. et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Определить активный центр фермента или иную структуру, обеспечивающую биологическое взаимодействие, возможно также путем физических методов анализа молекулярной структуры (например, ядерного магнитного резонанса, кристаллографии, дифракции электронов или меченая аффинными фотореагентами) в сочетании с внесением мутаций в те положения полипептидной цепи, аминокислотные остатки в которых предположительно формируют контактный участок (см., например, работу de Vos A.M. et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith R.A.G. et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver A. et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64). Выявить и идентифицировать критически важные аминокислотные остатки в молекуле белка можно также путем выравнивания аминокислотных последовательностей с родственными полипептидами. В публикации WO 2013/076253 описана кристаллическая структура мурамидазы *Acremonium alcalophilum* CBS114.92, установленная с разрешением 1,3 Å. Полученные в этой работе атомные координаты можно использовать для создания трехмерной модели молекулы мурамидазы *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 или гомологичных структур (например, вариантов этого белка по данному изобретению). С помощью данных рентгеноструктурного анализа установлено, что в каталитическом акте мурамидазы участвуют аминокислотные остатки D95 и E97 (положения указаны по последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном из своих воплощений данное изобретение относится к способу повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, включающему введение животному композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз; в указанном способе:

(а) микробная мурамидаза представляет собой микробный белок с мурамидазной активностью, который содержит один или более доменов, выбираемых из группы, состоящей из доменов семейств GH24 и GH25; микробную мурамидазу включают в корм для животного в количестве 300-500 мг белка-фермента на 1 кг корма;

(б) животное выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек куриц-молодок и цыплят;

(с) при необходимости микробную мурамидазу дают животному ежедневно в течение по меньшей мере 10 суток на протяжении жизни данной особи.

В другом своем воплощении данное изобретение относится к способу повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, включающему введение животному композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз; в указанном способе:

(а) микробная мурамидаза является мурамидазой из семейства GH24 или GH25, полученной (или ее получение возможно) из представителей типа Ascomycota, которую включают в корм для животного в количестве 300-500 мг белка-фермента на 1 кг корма;

(b) животное выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят;

(с) один из показателей качества навоза/помета улучшается по меньшей мере на 1% по сравнению с отрицательным контролем.

В другом своем воплощении данное изобретение относится к способу повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, включающему введение животному композиции, корма или кормовой добавки, содержащих одну или более микробных мурамидаз; в указанном способе

(а) микробная мурамидаза является мурамидазой из семейства GH24 или GH25, полученной (или ее получение возможно) из представителей типа Ascomycota, которую включают в корм для животного в количестве 300-500 мг белка-фермента на 1 кг корма;

(b) животное выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят; и

(с) пораженность пододерматитом у животных уменьшается по меньшей мере на 10% по сравнению с отрицательным контролем.

Препарат.

Микробная мурамидаза по данному изобретению входит в состав композиции для повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, которая также включается в объем данного изобретения. Микробная мурамидаза по данному изобретению может входить в состав жидкого или твердого препарата.

В случае жидкого препарата препаратобразующий агент может быть многоатомным спиртом (например, глицерином, этиленгликолем или пропиленгликолем), солью (например, хлоридом натрия, бензоатом натрия, сорбатом калия) или сахаром либо его производным (например, декстрином, глюкозой, сахарозой, сорбитом). Таким образом, композиция по данному изобретению может быть жидкой, содержащей микробную мурамидазу и один или более препаратобразующих агентов, выбираемых из группы, состоящей из глицерина, этиленгликоля, 1,2-пропиленгликоля, 1,3-пропиленгликоля, хлорида натрия, бензоата натрия, сорбата калия, декстрина, глюкозы, сахарозы и сорбита. Жидкую композицию по данному изобретению разбрызгивают по корму после его гранулирования или добавляют в воду для питья, которую дают животным.

В случае твердого препарата композиция по данному изобретению может быть в форме гранул, порошка (полученного распылительной сушкой) или крупки. В этом случае препаратобразующий материал может быть представлен солью (органической или неорганической; солями цинка, натрия, калия или кальция, например ацетатом кальция, бензоатом кальция, карбонатом кальция, хлоридом кальция, цитратом кальция, сорбатом кальция, сульфатом кальция, ацетатом калия, бензоатом калия, карбонатом калия, хлоридом калия, цитратом калия, сорбатом калия, сульфатом калия, ацетатом натрия, бензоатом натрия, карбонатом натрия, хлоридом натрия, цитратом натрия, сорбатом натрия, сульфатом натрия, ацетатом цинка, бензоатом цинка, карбонатом цинка, хлоридом цинка, цитратом цинка, сорбатом цинка, сульфатом цинка), крахмалом, сахаром или производным сахаров (например, сахарозой, декстрином, глюкозой, лактозой, сорбитом).

Твердая композиция по данному изобретению может быть в форме гранул. В таком препарате гранулы могут иметь матриксную структуру, в которой компоненты смешаны и распределены равномерно. Но обычно гранулы имеют неоднородную структуру, а именно сердцевинную часть и одну или более оболочек, образованных, как правило, солями и/или восковыми материалами. Примеры материалов для восковых оболочек: полиэтиленгликоли, полипропилены, карнаубский воск, канделильский воск, пчелиный воск, гидрогенизированные растительные масла или животный жир (например, говяжий), гидрогенизированное пальмовое масло, гидрогенизированное хлопковое масло и/или гидрогенизированное соевое масло, жирные спирты, моноглицериды и/или диглицериды (например, глицерилстеарат, в котором стеарат представлен смесью остатков стеариновой и пальмитиновой кислот), микрокристаллический воск, парафины, жирные кислоты (например, гидрогенизированные неразветвленные длинноцепочечные жирные кислоты и их производные). Предпочтительным восковым материалом по данному изобретению является пальмовое масло или гидрогенизированное пальмовое масло. Сердцевинная часть гранулы представляет собой гомогенную смесь мурамидазы по данному изобретению, при необходимости объединенной с одним или более дополнительными ферментами, и одной или более солей, или инертную частицу, несущую мурамидазу по данному изобретению, при необходимости объединенную с одним или более дополнительными ферментами.

В указанных выше гранулах материал для сердцевинной части выбирают из группы, состоящей из неорганических солей (например, ацетата кальция, бензоата кальция, карбоната кальция, хлорида кальция, цитрата кальция, сорбата калия, сульфата кальция, ацетата калия, крахмала или сахара, или производного сахаров (например, сахарозы, декстрина, глюкозы, лактозы, сорбита), низкомолекулярных

органических соединений, крахмала, муки, целлюлозы и минеральных веществ и глинистых минералов (называемых также гидратированными филлосиликатами алюминия). Предпочтительно сердцевинная часть гранулы содержит глинистый минерал, например каолинит или каолин.

Толщина солевой оболочки гранул составляет, как правило, 1 мкм; обычно такая оболочка образована какой-либо одной солью или смесью солей из числа сульфатов натрия (Na_2SO_4), калия (K_2SO_4), магния (MgSO_4) и/или цитрата натрия. Другие примеры оболочек гранул описаны в публикациях WO 2008/017659, WO 2006/034710, WO 1997/05245, WO 1998/54980, WO 1998/55599, WO 2000/70034; используются также оболочки из полимеров, как описано в публикации WO 2001/00042.

Композиция по данному изобретению предпочтительно твердая, содержит мурамидазу по данному изобретению и один или более препаратобразующих агентов, которые выбирают из группы, состоящей из хлорида натрия, бензоата натрия, сорбата калия, сульфата натрия, сульфата калия, сульфата магния, тиосульфата натрия, карбоната кальция, цитрата натрия, декстрина, глюкозы, сахарозы, сорбита, лактозы, крахмала и целлюлозы. Более предпочтительно препаратобразующим агентом выбирают из одного или более следующих веществ: сульфата натрия, декстрина, целлюлозы, тиосульфата натрия и карбоната кальция. Также предпочтительно, чтобы твердая композиция по данному изобретению была в форме гранул. Еще более предпочтительно, чтобы твердая композиция по данному изобретению была в форме гранул, содержащих сердцевинную часть, ферментный слой, включающий мурамидазу по данному изобретению, и солевую оболочку.

Препаратообразующий агент предпочтительно выбирают из одного или более следующих веществ: глицерина, этиленгликоля, 1,2-пропиленгликоля или 1,3-пропиленгликоля, хлорида натрия, бензоата натрия, сорбата калия, сульфата натрия, сульфата калия, сульфата магния, тиосульфата натрия, карбоната кальция, цитрата натрия, декстрина, глюкозы, сахарозы, сорбита, лактозы, крахмала, каолина и целлюлозы. Более предпочтительно препаратобразующим агентом выбирают из одного или более следующих веществ: 1,2-пропиленгликоля, 1,3-пропиленгликоля, сульфата натрия, декстрина, целлюлозы, тиосульфата натрия, каолина и карбоната кальция.

Корма и кормовые добавки для животных.

Микробная мурамидаза по данному изобретению также может входить в состав корма или кормовой добавки для животных с целью повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных; такие корма и кормовые добавки включаются в объем данного изобретения.

Кормовые композиции или корма для животных содержат относительно много белка. Характеристика кормов для домашней птицы и свиней представлена в таблице. В публикации WO 2001/058275 (колонки 2-3); характеристика кормов для рыб представлена в колонке 4 той же таблицы. В указанных в этой публикации кормах для рыб содержание сырого жира составляет 200-310 г/кг.

Кормовая композиция по данному изобретению характеризуется содержанием сырого белка 50-800 г/кг и содержит также одну или более микробных мурамидаз, как описано выше.

Также или в качестве альтернативы указанному выше содержанию сырого белка кормовая композиция для животных по данному изобретению характеризуется обменной энергией 10-30 МДж/кг; и/или содержанием кальция 0,1-200 г/кг; и/или содержанием доступного фосфора 0,1-200 г/кг; и/или содержанием метионина 0,1-100 г/кг; и/или содержанием метионина и цистеина (в сумме) 0,1-150 г/кг; и/или содержанием лизина 0,5-50 г/кг.

В частности, в кормовой композиции по данному изобретению обменная энергия и содержание сырого белка, кальция, фосфора, метионина, метионина в сумме с цистеином и/или лизина находится в любом из диапазонов 2, 3, 4 или 5, указанных в табл. В публикации WO 2001/058275 (R. 2-5).

Содержание азота в корме определяют методом Кьельдаля (А.О.А.С, 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе; Вашингтон, округ Колумбия (США), содержание сырого белка рассчитывают исходя из содержания азота (N) по формуле:

$$\text{сырой белок (г/кг)} = \text{N (г/кг)} \times 6,25.$$

Обменную энергию корма рассчитывают согласно Рекомендациям по питанию домашних свиней (стр. 2-6 в 9-м переработанном издании, 1988) подкомитета по питанию домашних свиней комитета по питанию животных отдела сельского хозяйства Национального научно-исследовательского совета (National Academy Press, Вашингтон, округ Колумбия, США) и таблицам энергосодержания кормов для домашней птицы Спелдерхолтского центра по исследованию и разведению домашней птицы (7361 DA Бекберген, Нидерланды (Grafisch bedrijf Ponsen&looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5).

Содержание кальция, доступного фосфора и аминокислот в полноценных кормах для животных рассчитывают, используя соответствующие таблицы, например, в издании Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

Кормовая композиция по данному изобретению содержит по меньшей мере один растительный белок (см. выше).

Кормовая композиция по данному изобретению также может содержать животный белок, например мясо-костную муку, перьевую муку и/или рыбную муку, как правило, в количестве 0-25%. Кормовая

композиция по данному изобретению также может содержать сухую зерновую барду с гидролизатами (DDGS), как правило, в количестве 0-30%.

Предпочтительно кормовая композиция по данному изобретению содержит 0-80% кукурузы и/или 0-80% сорго, и/или 0-70% пшеницы, и/или 0-70% ячменя, и/или 0-30% овса, и/или 0-40% соевого шрота, и/или 0-25% рыбной муки, и/или 0-25% мясо-костной муки, и/или 0-20% сыворотки.

Предпочтительно кормовая композиция по данному изобретению содержит растительные белки. Содержание растительных белков в указанной композиции составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% (мас./мас.).

По данному изобретению растительный белок берется из таких источников, как бобовые и зерновые, например из материала растений семейств Fabaceae (бобовых), Scutigeraceae (крестоцветных), Chenopodiaceae (маревых) и Poaceae (злаков), например соевые мука или шрот, мука из люпина, рапсовые жмых, шрот или мука или их комбинации.

Источником растительного белка может быть материал из растений одного или более видов семейства Fabaceae, например, из плодов сои, люпина, гороха или фасоли. Источником растительного белка может быть материал из растений одного или более видов семейства Chenopodiaceae, например, свеклы, сахарной свеклы, шпината или кинвы (киноа). Другие примеры источников растительного белка - рапс и капуста. Предпочтительным источником растительного белка являются плоды сои. Другие примеры источников растительного белка - злаки, например ячмень, пшеница, рожь, овес, кукуруза, рис и сорго.

Корм для животных может быть изготовлен в гранулированной форме или в форме мешанки (не гранулированный). Как правило, молотые кормовые продукты смешивают и добавляют в эту смесь достаточное количество витаминов и минеральных веществ в зависимости от видовых особенностей животного. В корма добавляют ферменты в виде твердых или жидких ферментных препаратов. Например, в случае мешанки твердый или жидкий ферментный препарат добавляют в процессе смешивания ингредиентов или до этого. В случае гранулированного корма жидкий или твердый ферментный/мурамидазный препарат добавляют также в процессе смешивания ингредиентов или до этого. Как правило, жидкий ферментный препарат содержит микробную мурамидазу по данному изобретению, при необходимости вместе с многоатомным спиртом, например глицерином, этиленгликолем или пропиленгликолем, и его добавляют после этапа гранулирования, например путем разбрызгивания на гранулы. Также мурамидазу можно включать в состав кормовых добавок или премиксов.

Или же микробную мурамидазу по данному изобретению можно включить в состав корма для животных путем замораживания смеси жидкого ферментного раствора с структурообразующим компонентом корма, например с молотым соевым шротом, и последующей лиофилизации этой смеси.

По данному изобретению корм для животных может содержать также один или более дополнительных ферментов, микроорганизмы, витамины, минеральные вещества, аминокислоты и/или другие кормовые ингредиенты.

Предпочтительно предлагаемая в настоящем документе композиция содержит одну или более микробных мурамидаз по данному изобретению, один или более препаратобразующих агентов и один или более компонентов, выбираемых из группы, включающей один или более дополнительных ферментов, один или более микроорганизмов, один или более витаминов, одно или более минеральных веществ, одну или более аминокислот и один или более других кормовых ингредиентов.

В композиции по данному изобретению конечная концентрация мурамидазы может быть в диапазоне 0,01-200 мг белка-фермента на 1 кг корма, например 0,1-150 мг; 0,5-100 мг; 1-75 мг; 2-50 мг; 3-25 мг; 2-80 мг; 5-60 мг; 8-40 мг или 10-30 мг белка-фермента на 1 кг корма, или любые варианты в указанных диапазонах.

На сегодняшний день считается, что микробную мурамидазу включают в состав корма в одном или более из следующих количеств (указаны диапазоны в мг/кг, то есть в частях на миллион - ppm) 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 5-50; 10-100; 0,05-50; 5-25 или 0,10-10.

Чтобы установить содержание мурамидазы в корме (мг/кг), ее очищают из кормовой композиции и определяют удельную ферментативную активность очищенной мурамидазы соответствующим аналитическим методом (см. в разделе о мурамидазной активности). Определяют также мурамидазную активность кормовой композиции как таковой тем же аналитическим методом и по данным этих двух определений рассчитывают содержание мурамидазы, то есть количество этого белка в миллиграммах на 1 килограмм корма.

Кормовая добавка для животных по данному изобретению предназначена для включения в рацион или корм животного (или для назначения включения) в количестве 0,01-10,0%; в частности, 0,05-5,0% или 0,2-1,0% (% здесь означает количество граммов на 100 граммов корма). То же относится также, в частности, к премиксам.

Содержание мурамидазы (количество миллиграммов белка) в кормовых добавках определяют таким же образом, как в корме. Разумеется, если имеется образец мурамидазы, которую использовали для изготовления данной кормовой добавки или данного корма, то удельную ферментативную активность определяют по этому образцу (то есть не нужно очищать мурамидазу из кормовой композиции или из кормовой добавки).

Дополнительные ферменты.

Кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению при необходимости включает один или более ферментов. Используемая в настоящем документе классификация ферментов базируется на номенклатуре ферментов, рекомендованной Комиссией по номенклатуре ферментов Международного союза биохимии и молекулярной биологии (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; NC-IUBMB, Academic Press, Inc., 1992); см. Также интернет-сайт <http://www.exPASy.ch/enzyme> где собирается информация по номенклатуре ферментов. Согласно этой номенклатуре каждому специфическому ферменту присваивается номер ЕС (Enzyme Commission) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Классификация ферментов IUBMB основывается на субстратной специфичности и молекулярном механизме каталитического акта, но не отражает структурных особенностей фермента.

Существуют также классификации определенных ферментов, в частности гликозидгидролаз, к числу которых принадлежат, например, эндогликаназа, ксиланаза, галактаназа, маннаназа, декстраназа, мурамидаза и галактозидаза; эта классификация описана в работе Henrissat B. et al., "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013", Nucl. Acids Res. (1 January 2014) 42 (D1): D490-D495; см. также www.cazy.org.

Кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению может содержать помимо мурамидазы по меньшей мере один другой фермент, который выбирают из группы, состоящей из фитазы (ЕС 3.1.3.8 или 3.1.3.26), ксиланазы (ЕС 3.2.1.8); галактаназы (ЕС 3.2.1.89); а-галактозидазы (ЕС 3.2.1.22); протеазы (ЕС 3.4); фосфолипазы А1 (ЕС 3.1.1.32); фосфолипазы А2 (ЕС 3.1.1.4); лизофосфолипазы (ЕС 3.1.1.5); фосфолипазы С (ЕС 3.1.4.3); фосфолипазы D (ЕС 3.1.4.4); амилазы, например а-амилазы (ЕС 3.2.1.1); арабинофуранозидазы (ЕС 3.2.1.55); β-ксилозидазы (ЕС 3.2.1.37); ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72); ферулоилэстеразы (ЕС 3.1.1.73); целлюлазы (ЕС 3.2.1.4); целлобиогидролаз (ЕС 3.2.1.91); Р-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21); пуллулазы (ЕС 3.2.1.41), а-маннозидазы (ЕС 3.2.1.24), маннаназы (ЕС 3.2.1.25) и β-глюканазы (ЕС 3.2.1.4 или ЕС 3.2.1.6) или любых их комбинаций.

Примеры имеющихся в продаже препаратов фитаз включают Bio-Feed™ Phytase (Novozymes), Ronozyme® Р, Ronozyme® NP и Ronozyme® HiPhos (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase® и Quantum® Blue (AB Enzymes), OptiPhos® (Huvepharma) Phyzyme® XP (Verenium/DuPont) и Axtra® PHY (DuPont). Другие предпочтительные фитазы включают ферменты, описанные, например, в публикациях WO 98/28408, WO 00/43503, и WO 03/066847.

Примеры имеющихся в продаже препаратов ксиланаз включают Ronozyme® WX и Ronozyme® G2 (DSM Nutritional Products), Econase® XT и Barley (AB Vista), Xylathin® (Verenium), Hostazym® X (Huvepharma) и Axtra® XB (ксиланаза/β-глюканаза, DuPont).

Примеры имеющихся в продаже препаратов протеаз включают Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products).

Микроорганизмы.

Кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать один или более дополнительных микроорганизмов. Например, кормовая композиция или корм по данному изобретению содержит бактерии одного или более из следующих родов:

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*,
Enterococcus, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*
и *Megasphaera*

или любые их комбинации.

Предпочтительно кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению содержит бактерии одного или более из следующих видов:

Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*,
Bacillus polymyxa, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Enterococcus faecium*,
Enterococcus spp. и *Pediococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp,
Lactobacillus acidophilus, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*,
Propionibacterium thoenii, *Lactobacillus farcimimus*, *lactobacillus rhamnosus*,
Clostridium butyricum, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Lactobacillus reuteri*,
Lactobacillus salivarius ssp. *salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria* sp.

Более предпочтительно кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению содержит один или более из следующих штаммов бактерий:

Bacillus

subtilis: 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507), 22C-P1 (PTA-6508), 2084 (NRRL B-500130), LSSA01 (NRRL-B-50104), BS27 (NRRL B-501 05), BS 18 (NRRL B-50633), BS 278 (NRRL B-50634), DSM 29870, DSM 29871, NRRL B-50136, NRRL B-50605, NRRL B-50606, NRRL B-50622 и PTA-7547.

Более предпочтительно кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению содержит один или более из следующих штаммов бактерий *Bacillus pumilus*: NRRL B-50016, ATCC 700385, NRRL B-50885 или NRRL B-50886.

Более предпочтительно кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению содержит один или более из следующих штаммов бактерий *Bacillus lichenformis*: NRRL B 50015, NRRL B-50621 или NRRL B-50623.

Более предпочтительно кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению содержит один или более из следующих штаммов бактерий:

Bacillus

amyloliquefaciens: DSM 29869, DSM 29872, NRRL B 50607, PTA-7543, PTA-7549, NRRL B-50349, NRRL B-50606, NRRL B-50013, NRRL B-50151, NRRL B-50141, NRRL B-50147 или NRRL B-50888.

Содержание бактерий каждого из штаммов в кормовой композиции, корме или кормовой добавке по данному изобретению составляет от 1×10^4 до 1×10^{14} колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 кг сухой массы, предпочтительно от 1×10^6 до 1×10^{12} КОЕ/кг, более предпочтительно от 1×10^7 до 1×10^{11} , наиболее предпочтительно от 1×10^8 до 1×10^{10} КОЕ/кг (сухой массы).

Дозировка бактерий каждого из штаммов, присутствующих в кормовой композиции, корме или кормовой добавке по данному изобретению, составляет от 1×10^5 до 1×10^{15} колониеобразующих единиц на одну особь в сутки, предпочтительно от 1×10^7 до 1×10^{13} КОЕ/особь/сут, более предпочтительно от 1×10^8 до 1×10^{12} КОЕ/особь/сут, наиболее предпочтительно от 1×10^9 до 1×10^{11} КОЕ/особь/сут.

В кормовой композиции, корме или кормовой добавке по данному изобретению один или более штаммов бактерий могут присутствовать в форме стабильных спор.

Премикс.

Кормовая композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может включать премикс, содержащий, например, витамины, минеральные вещества, ферменты, аминокислоты, консерванты, антибиотики, другие кормовые ингредиенты или любые их комбинации, смешанные с кормом для животных.

Аминокислоты.

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать одну или более аминокислот. Примеры таких аминокислот включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) лизин, аланин, β -аланин, треонин, метионин и триптофан.

Витамины и минеральные вещества.

Кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению может также включать один или более витаминов, например, один или более жирорастворимых витаминов и/или один или более водорастворимых витаминов. При необходимости кормовая композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению может включать одно или более минеральных веществ, например, один или более микроэлементов и/или один или более макроэлементов.

Обычно жиро- и водорастворимые витамины, а также микроэлементы входят в состав премикса, предназначенного для добавления в корм, а макроэлементы добавляются в корм отдельно.

Примеры жирорастворимых витаминов (не имеющие ограничительного характера) включают витамин А, витамин D₃, витамин Е и витамин К, например витамин К₃.

Примеры водорастворимых витаминов (не имеющие ограничительного характера) включают витамин В₁₂, биотин и холин, витамин В₁, витамин В₂, витамин В₆, ниацин, фолиевую кислоту и пантотенат, например, D-пантотенат кальция.

Примеры микроэлементов (не имеющие ограничительного характера) включают бор, кобальт, хлорид-ион, хром, медь, фтор, йод, железо, марганец, молибден, селен и цинк.

Примеры макроэлементов (не имеющие ограничительного характера) включают кальций, магний, калий и натрий.

Потребности организма животного в этих компонентах (на примере домашней птицы и свиней/поросят) приведены в табл. А публикации WO 2001/058275. "Потребность" в данном контексте озна-

чает, что эти компоненты должны содержаться в рационе животного в указанных количествах.

Или же кормовая композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению содержит по меньшей мере один из отдельных компонентов, приведенных в табл. А публикации WO 01/58275. Здесь "по меньшей мере один" означает какой-либо из; один или более из; один или два, или три, или четыре и так далее до тринадцати, или до пятнадцати отдельных компонентов. Говоря конкретнее, указанный по меньшей мере один отдельный компонент входит в состав композиции, корма или кормовой добавки для животных по данному изобретению в таком количестве, что концентрация этого компонента в данном кормовом продукте находится в пределах, указанных в четвертом, или пятом, или шестом столбце табл. А.

Предпочтительно кормовая добавка по данному изобретению содержит по меньшей мере один из указанных ниже витаминов в таком количестве, что его концентрация в данном кормовом продукте находится в пределах, указанных в табл. 1 ниже (для рационов поросят и бройлеров).

Таблица 1

Типичные рекомендации по содержанию витаминов в рационе

Витамин	Рацион поросят	Рацион бройлеров
Витамин А	10 000-15 000 МЕ/кг корма	8-12 500 МЕ/кг корма
Витамин D ₃	1800-2000 МЕ/кг корма	3000-5000 МЕ/кг корма
Витамин Е	60-100 мг/кг корма	150-240 мг/кг корма
Витамин К ₃	2-4 мг/кг корма	2-4 мг/кг корма
Витамин В ₁	2-4 мг/кг корма	2-3 мг/кг корма
Витамин В ₂	6-10 мг/кг корма	7-9 мг/кг корма
Витамин В ₆	4-8 мг/кг корма	3-6 мг/кг корма
Витамин В ₁₂	0,03-0,05 мг/кг корма	0.015-0,04 мг/кг корма
Ниацин (Витамин В ₃)	30-50 мг/кг корма	50-80 мг/кг корма
Пантотеновая кислота	20-40 мг/кг корма	10-18 мг/кг корма
Фолиевая кислота	1-2 мг/кг корма	1-2 мг/кг корма
Биотин	0,15-0,4 мг/кг корма	0,15-0,3 мг/кг корма
Хлорид холина	200-400 мг/кг корма	300-600 мг/кг корма

МЕ - международная единица биологической активности.

Другие кормовые ингредиенты.

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать красители, стабилизирующие агенты, добавки, стимулирующие рост, вкусоароматические вещества, полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA); соединения, генерирующие активные формы кислорода; пептиды с противомикробным действием и полипептиды с противогрибковым действием.

Примерами красителей по данному изобретению являются каротиноиды, например β-каротин, астаксантин и лютеин.

Примерами стабилизирующих агентов по данному изобретению (например, закисляющих агентов) являются органические кислоты, например, бензойная кислота (VevoVital®), DSM Nutritional Products), муравьиная, масляная, фумаровая и пропионовая кислоты.

Примерами вкусоароматических агентов по данному изобретению являются 2-метокси-4-метилфенол (креозол), анетол, дека-, ундека- и/или додекалактоны, иононы, ирон (метилюнон), гингерол, пиперидин, пропилиденфталид, бутилиденфталид, капсаицин и таннин.

Примерами полиненасыщенных жирных кислот по данному изобретению являются полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие 18, 20 и 22 атома углерода, например, арахидоновая, докозогексаеновая, эйкозапентаеновая и γ-линолевая кислоты.

Примерами агентов, генерирующих активный кислород, являются такие неорганические соединения, как перборат, персульфат или перкарбонат, а также такие ферменты, как оксидазы, оксигеназы или синтетазы.

Примерами противомикробных пептидов (AMP) являются CAP18, лейкоцин А, триптицин, протегрин-1, танатин, дефенсины, лактоферрин, лактоферрицин и овиспирин (например, новиспирин; см. Lehrer R.I. et al., 2000), плектасин и статины, в том числе соединения и полипептиды, описанные в публикациях WO 03/044049 и WO 03/048148, а также варианты и фрагменты указанных веществ, сохраняющие противомикробную активность.

Примерами противомикробных полипептидов (AFP) являются пептиды из *Aspergillus giganteus* и *Aspergillus niger*, а также их варианты и фрагменты, сохраняющие противомикробную активность (см. публикации WO 94/01459 и WO 02/090384).

Применение микробного лизоцима.

В другом своем аспекте данное изобретение относится к композиции, корму или кормовой добавке для животных, предназначенных для повышения качества навоза/помета и/или уменьшения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, которые содержат одну или более микробных мурамидаз.

По данному изобретению микробную мурамидазу вводят в состав корма для животных в количестве 100-1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например, 200-900 мг, 300-800 мг, 400-700 мг, 500-600 мг белка-фермента на 1 кг корма или любые комбинации указанных диапазонов.

По данному изобретению животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, домашней птицы, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят, кошек, собак; лошадей, ракообразных, пильчатых и настоящих креветок, рыб, желтохвостов, арапайм, барбусов, каменных окуней, луфарей, прохилодусов, лещей, бычков и лисичек, бурого паку, карпов, сомов и зубаток, катли, молочную рыбу, гольцов, цихлид, кобий, треску и других тресковых, краппи, корифен, горбылей, угрей, пескарей, карасей, гурами, гарруп и групперов, парахромисов, палтусов, камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов, макрель, ханосов, лактаров, герресов, махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пираньевых, цейлонского этроплюса, аргентинскую атерину (одонтеста), терапон, баррамунди и других окуневых, шук, трахинотом и помпан, плотву, лососевых, судаков (в том числе светлоперого), длинноусого гетеробранха, вареху, нотрописов и масляную рыбу, головешек, змееголовов, луцианов, робал, камбал, пестряков, осетров, солнечных, линей, акар, тилапий, форелей, тунцов, палтусов, ряпушку, сигов. Предпочтительно животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, домашней птицы, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят. Более предпочтительно животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек и цыплят.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают животному в составе корма от рождения до забоя. Предпочтительно микробную мурамидазу дают животному ежедневно в составе корма от рождения до забоя. Более предпочтительно микробную мурамидазу дают животному ежедневно в составе корма в течение по меньшей мере 10 суток, например, по меньшей мере 15 суток или по меньшей мере 20 суток (указанное количество суток берется подряд или с перерывами) на протяжении жизни данной особи. В одном из воплощений данного изобретения микробную мурамидазу дают животному в составе корма в течение 10-20 суток, после чего делают перерыв продолжительностью 5-10 суток и повторяют этот цикл на протяжении всей жизни данной особи.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в первые 49 суток после вылупления. Предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в первые 36 суток после вылупления. Более предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в период с 22-х по 36-е сутки после вылупления. Еще более предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в течение предстартового периода (с 1-х по 7-е сутки). Еще более предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в течение стартового периода (с 8-х по 22-е сутки). Еще более предпочтительно микробную мурамидазу дают бройлерам с кормом в течение предстартового (с 1-х по 7-е сутки) и стартового периодов (с 8-х по 22-е сутки).

По данному изобретению микробную мурамидазу дают курицам-несушкам с кормом в течение жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают курицам-несушкам с кормом в течение 76 недель после вылупления. Более предпочтительно микробную мурамидазу дают курицам-несушкам с кормом в течение периода яйценоскости (начиная примерно с 18-й недели жизни). Еще более предпочтительно микробную мурамидазу дают курицам-несушкам с кормом в течение периода яйценоскости, но делают перерыв на период принудительной линьки.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают домашним индейкам с кормом в течение жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают домашним индейкам с кормом в течение 24 недель после вылупления. Более предпочтительно микробную мурамидазу дают индюшкам с кормом в первые 16 недель после вылупления, индюшкам - в первые 20 недель после вылупления.

По данному изобретению микробную мурамидазу дают свиньям в течение всей жизни животного. Предпочтительно микробную мурамидазу дают свиньям в течение 27 недель начиная с момента рождения. Более предпочтительно давать микробную мурамидазу поросятам начиная с момента рождения и до отъема от свиноматки (в возрасте 4 недель). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу поросятам в течение 6 недель начиная с момента рождения (4 недели молочного вскармливания и 2 недели после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу поросятам-отъемышам в течение предстартового периода (с 1-х по 14-е сутки после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу поросятам-отъемышам в течение стартового периода (с 15-х по 42-е сутки после отъема). Еще предпочтительнее давать микробную мурамидазу поросятам-отъемышам в течение предстартового (с 1-х по 14-е сутки после отъема) и стартового периодов (с 15-х по 42-е сутки после отъема). Еще пред-

почтительнее давать микробную мурамидазу свиньям в течение периода роста/откорма (с 10-й по 27-ю неделю после рождения).

По данному изобретению микробная мурамидаза может быть грибного происхождения. Предпочтительно микробную мурамидазу получают (или она может быть получена) из представителей типа *Ascomycota*, например, подтипа *Pezizomycotina*. Предпочтительно микробная мурамидаза по данному изобретению содержит один или более доменов, выбираемых из группы, состоящей из GH24 и GH25.

Примеры

Штаммы.

Штамм *Trichophaea saccata* CBS804.70 был предоставлен Центральным бюро микробиологических культур (Утрехт, Нидерланды). По сведениям этой организации, штамм *Trichophaea saccata* CBS804.70 был выделен из почвы терриконов в районе разработки месторождения угля в графстве Стаффордшир (Великобритания) в мае 1968 г.

По сведениям Центрального бюро микробиологических культур Нидерландов, штамм *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 был выделен А. Yoneda в 1984 г. из свиного навозного компоста близ озера Цу-куи (Япония).

Среды и растворы.

Среда YP+глюкоза - дрожжевой экстракт (1%), пептон (2%), глюкоза (2%).

Среда YP+мальтодекстрин - дрожжевой экстракт (1%), пептон (2%), мальтодекстрин (2%).

Планшеты с картофельно-декстрозным агаром (PDA) готовили следующим образом. Делали картофельный отвар (300 г картофеля хорошо мыли, но не счищали кожуру, нарезали ломтиками и кипятили в воде в течение 30 мин, после чего процеживали через марлю), доливали дистиллированной воды до общего объема суспензии 1 л, добавляли 20 г декстрозы и 20 г порошка агар-агара. Полученную среду помещали в автоклав на 15 мин при давлении 15 psi (*Bacteriological Analytical Manual*, 8-е издание, переработанный вариант А, 1998).

Планшеты с лизогенной средой (LB) содержали среду следующего состава: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г хлорида натрия, 15 г бактоагара и деионизованную воду до объема 1 л.

Лизогенная среда (LB) содержала 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г хлорида натрия и деионизованную воду до объема 1 л.

Планшеты со средой COVE с сахарозой, содержали 342 г сахарозы, 20 г порошка агар-агара, 20 мл солевого раствора солей COVE и деионизованную воду до объема 1 л. Эту среду стерилизовали в автоклаве в течение 15 мин при давлении 15 psi (*Bacteriological Analytical Manual*, 8-е издание, переработанный вариант А, 1998). Среду остужали до 60°C и добавляли ацетамид (10 мМ), хлорид цезия (15 мМ CsCl), октилфенолэтоксилат (TRITON® X-100; 50 мкл/500 мл).

Солевой раствор COVE содержал 26 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 26 г KCL, 26 г KH_2PO_4 , 50 мл раствора микроэлементов COVE и деионизованную воду до объема 1 л.

Раствор микроэлементов COVE содержал 0,04 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$; 0,4 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1,2 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,7 г $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,8 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 10 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и деионизованную воду до объема 1 л.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка мурамидазы GH25 из *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92.

Клонирование и экспрессию мурамидазы GH25 из *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 (SEQ ID NO: 1) осуществляли, как описано в примере 8 публикации WO 2013/076253; очистку проводили, как описано в примере 5 этой же работы. Клонирование и экспрессию SEQ ID NO: 10 проводили, как описано в примере 2 той же публикации.

Пример 2. Экспрессия мурамидазы GH24 из *Trichophaea saccata*.

Указанный штамм грибов культивировали в 100 мл среды YP+глюкоза (2%) во встряхиваемых колбах Эрленмейера объемом 1000 мл в течение 5 суток при температуре 20°C. После этого собирали мицелий путем фильтрования содержимого колб под вакуумом на бюхнеровской воронке с фильтром MIRA-CLOTH® (EMD Millipore, Биллерика, шт. Массачусетс, США). Мицелий замораживали жидким азотом и хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования. Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNEASY® Plant Maxi Kit (Qiagen GmbH, Хильден, Германия) согласно инструкциям производителя.

Секвенирование генома проводили с помощью технологии Illumina (система MySeq; Illumina Inc., Сан-Диего, шт. Калифорния, США). 5 мкг геномной ДНК, выделенной из *Trichophaea saccata*, использовали для приготовления библиотеки согласно инструкции производителя. Технологию парных концов применяли для получения библиотеки 200-500 п.н. Выход половины запуска на приборе HiSeq с длиной прочтения 100 п.н. составил 95 744 298 сырых ридов. Прочтения триммировали и сортировали по качеству, экстрагируя наиболее длинные с показателем Phred-score 10 или выше. Сборку осуществляли с помощью программы *Idba v. 0.19*. Контиги короче 400 п.н. удаляли из анализа. В результате получили 8 954 791 030 п.н. с N=50=10 035 п.н. Для аннотации генов применяли *GeneMark.hmm ES v. 2.3c*, каталитический домен идентифицировали с помощью скрытой модели Маркова "фаговая мурамидаза PF00959",

поддерживаемой базой данных семейств белковых доменов Pfam. Нуклеотидную последовательность, кодирующую искомым полипептид, клонировали из геномной ДНК *Trichophaea saccata* CBS804.70 путем полимеразной цепной реакции (PCR), используя праймеры F-80470 и R-80470 (SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно, как описано ниже.

5'-ACACAACTGGGGATCCACCATGCACGCTCTCACCTTCT-3' (SEQ ID NO: 6)

5'-CTAGATCTCGAGAAAGCTTTTAGCACTTGGGAGGGTGGG-3' (SEQ ID NO: 7)

Выделенные буквы - нуклеотиды последовательности, кодирующей фермент *Trichophaea saccata*. Сайты рестрикции подчеркнуты. Последовательность слева от сайтов рестрикции гомологична сайтам встраивания в вектор pDau109 (см. WO 2005/042735).

Для экспериментов использовали смесь для полимеразной цепной реакции Extensor HIFI PCR mix (концентрация 2×) (Thermo Scientific, номер по каталогу АВ-0795).

Амплификацию (25 мкл) проводили согласно инструкциям производителя (Thermo Scientific, номер по каталогу АВ-0795) при следующих конечных концентрациях:

Смесь для ПЦР.

0,5 мкМ праймер F-80470,

0,5 мкМ праймер R-80470,

12,5 мкл Extensor HIFI PCR mix, конц. 2×,

11,0 мкл H₂O,

10 нг геномной ДНК *Trichophaea saccata* CBS804.70.

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере DYAD® Dual-Block (BioRad, США): 1 цикл - 30 с при температуре 94°C; 30 циклов - каждый 30 с при 94°C, 30 с при 52°C и 60 с при 68°C; затем 1 цикл - 6 мин при 68°C. Образцы остужали до температуры 10°C, после чего проводили дальнейшую обработку.

Анализировали 3 мкл смеси, полученной в результате ПЦР, путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле с буферным раствором TAE [40 мМ трис(гидроксиметил)аминометан (Tris); 20 мМ ацетат натрия; 1 мМ этилендиаминтетраацетат натрия двузамещенный (EDTA)]. Наблюдалась широкая полоса, соответствующая 946 п.н. Остальную смесь, полученную в результате ПЦР, очищали непосредственно с помощью набора ILLUSTRATE™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Пискатауэй, шт. Нью-Джерси, США) согласно инструкциям производителя

Плазмиду pDau109 в количестве 2 мкг расщепляли рестриктазами Bam HI и Hind II, полученный материал анализировали путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле с буферным раствором TBE (50 мМ Tris+50 мМ борная кислота+1мМ Na₂-EDTA), чтобы удалить "лишний" фрагмент из расщепленной плазмиды. Полосы выявляли, добавляя краситель SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies Corporation, Гранд-Айленд, шт. Нью-Йорк, США) и используя трансиллюминатор с длиной волны 470 нм. Вырезали полосу, соответствующую расщепленной плазмиде, и проводили очистку с помощью набора ILLUSTRATE™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Плазмиду элюировали раствором 10 мМ Tris (pH 8,0) и доводили концентрацию до 20 нг/мкл. Для клонирования фрагмента длиной 983 п.н., полученного путем ПЦР, в плазмиде pDau109, расщепленной Bam HI и Hind III, (20 нг) использовали набор IN-FUSION® PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc., Маунтин-Вью, шт. Калифорния, США). Общий объем реакционной смеси IN-FUSION® составлял 10 мкл. Реакционной смесью IN-FUSION® трансформировали клетки FUSION-BLUE™E. coli (Clontech Laboratories, Inc., Маунтин-Вью, шт. Калифорния, США) согласно протоколу производителя и высевали эти клетки на планшеты с агаром LB, содержащим ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, после чего наблюдали растущие колонии трансформированных клеток.

Для анализа путем ПЦР с использованием праймеров вектора pDau109, описанных выше, отобрали несколько колоний. Четыре из них перенесли с помощью желтой инокуляционной иглы (Nunc A/S, Дания) из планшетов с агаром LB, содержащим 50 мкг/мл ампициллина, в новые планшеты с агаром LB, содержащим 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

Праймер 8653: 5'-GCAAGGGATGCCATGCTTGG-3' (SEQ ID NO: 8)

Праймер 8654: 5'-CATATAACCAATTGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 9)

Каждую колонию переносили непосредственно в пробирку для ПЦР объемом 200 мкл, содержащую 5 мкл смеси 2× Extensor HIFI PCR mix (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, шт. Иллинойс, США); 0,5 мкл праймера 8653 (10 пм/мкл); 0,5 мкл праймера 8654 (10 пм/мкл) и 4 мкл деионизированной воды. Инкубировали в термоциклере DYAD® Dual-Block (1 цикл - 60 с при температуре 94°C; 30 циклов - по 30 с при 95°C, 45 с при 60°C, 60 с при 72°C, 10 мин при 68°C и 10 мин при 10°C).

Каждую из полученных в результате ПЦР смесей в количестве 3 мкл подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле с буферным раствором TAE. Все четыре трансформанта *E. coli* характеризовались наличием полосы, соответствующей примерно 980 п.н. Из каждой такой колонии выделили плазмидную ДНК с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Хильден, Германия). Полу-

ченную плазмидную ДНК секвенировали, используя праймеры 8653 и 8654 (SEQ ID NO: 8 и 9), с помощью автоматического севенатора Applied Biosystems Model 3730 и набора реагентов для секвенирования BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Inc., Фостер-Сити, шт. Калифорния, США). Для трансформации *Aspergillus oryzae* MT3568 выбрали плазмиду рККSC0312-2. Штамм *A. oryzae* MT3568 является производным штамма *Aspergillus oryzae* JaL355, отличаясь от него тем, что путем инактивации гена *amdS* (кодирующего ацетамидазу) восстановлена ауксотрофность по урацилу, вызванная делецией в гене *rutG* (см. публикацию WO 2002/40694). Получали протопласты *A. oryzae* MT3568 способом, описанным в Европейском патенте № 0238023 (с. 14-15).

Клетки *E. coli* 3701, содержащие плазмиду рККSC0312-2, культивировали в течение ночи согласно инструкциям производителя (Genomed). Выделяли плазмидную ДНК рККSC0312-2, используя набор Plasmid Midi Kit (Genomed JETquick kit, номер по каталогу 400250, GENOMED GmbH, Германия) согласно инструкциям производителя. Очищенной плазмидной ДНК трансформировали *Aspergillus oryzae* MT3568. Получали протопласты *A. oryzae* MT3568 способом, описанным в работе Christensen T. et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Селекционные планшеты содержали COVE с сахарозой +10 мМ ацетамид +15 мМ CsCl + TRITON® X-100 (50 мкл/500 мл). Планшеты инкубировали при температуре 37°C. К 100 мкл протопластов MT3568 прибавляли 8 мкл плазмидной ДНК (3 мкг ДНК). Затем добавляли 250 мкл 60%-ного раствора полиэтиленгликоля (PEG), осторожно перемешивали и пробирки инкубировали при температуре 37° в течение 30 мин. Полученную смесь добавляли к 10 мл предварительно расплавленной легкоплавкой агарозы Cove (легкоплавкую агарозу расплавляли, а перед добавлением протопластной смеси температуру доводили до 40°C на теплой водяной бане). Объединенную смесь высевали на две селекционные чашки Петри, содержавшие Cove с сахарозой и 10 мМ ацетамида. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 4 суток. Отдельные колонии трансформированного *Aspergillus* идентифицировали по росту на чашках, содержавших ацетамид в качестве источника углерода. Каждый из четырех трансформантов *A. oryzae* инокулировали в 750 мкл среды YP, содержавшей 2% глюкозы, а также 750 мкл 2%-ного мальтодекстрина и DAP4C, на 96-луночных глубоких планшетах и инкубировали стационарно при температуре 37°C в течение 4 суток. Одновременно указанные четыре трансформанта высевали штрихами на агар COVE-2 с сахарозой.

Среду, в которой культивировались трансформанты *Aspergillus oryzae*, анализировали, чтобы выявить образование полипептида GH24, путем гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), используя гели NUPAGE® 10% Bis-Tris SDS (Invitrogen, Карлсбад, шт. Калифорния, США) согласно рекомендациям производителя. У каждого из четырех трансформантов *Aspergillus oryzae* наблюдалась полоса белка, соответствующая молекулярной массе приблизительно 27 кДа. Один из этих трансформантов культивировали во встряхиваемых колбах Эрленмейера объемом 1000 мл, содержавших по 100 мл среды с DAP4C, при температуре 26°C и перемешивании со скоростью 85 об/мин в течение 4 суток.

Пример 3. Очистка мурамидазы GH24 из *Trichophaea saccata*.

Супернатант культуральной среды, содержащий мурамидазу GH24 (см. пример 2), фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр Fast PES Bottle top с порогом отсеечения по размеру частиц 0,22 мкм. Полученный раствор подвергали диафильтрации с раствором ацетата натрия (5 мМ; pH 4,5) и концентрировали (объем сокращался в 10 раз) с помощью ультрафильтрационной установки (Sartorius) с порогом отсеечения по молекулярной массе 10 кДа.

После предварительной обработки раствор, содержащий мурамидазу, в количестве 275 мл очищали хроматографическим путем, используя сефарозу с сульфопропиловыми группами (SP) в количестве приблизительно 60 мл в колонке XK26 и элюируя связанную мурамидазу в градиенте концентрации (0-100%) буферных растворов А (50 мМ ацетат натрия; pH 4,5) и В (50 мМ ацетат натрия +1 М хлорид натрия; pH 4,5) в 10-кратном объеме колонки. Фракции с колонки собирали на основании данных хроматограммы (длина волны поглощения 280 нм и 254 нм) и электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE).

По данным SDS-PAGE молекулярная масса выделенного белка составляла приблизительно 27 кДа, чистота >90%.

Пример 4. Другие свойства мурамидазы GH24 из *Trichophaea saccata*.

Была определена N-концевая последовательность: YPVKTDL.

Расчетная молекулярная масса по зрелой аминокислотной последовательности составила 26205,5 Да (протонированная молекула M+H)⁺.

Молекулярная масса, определенная для интактного белка, составила 26205,3 Да (протонированная молекула M+H)⁺.

Зрелая аминокислотная последовательность (по данным секвенирования по Эдману с отщеплением N-концевого остатка, прямого определения молекулярной массы интактного белка и протеомного анализа):

YPVKTDLHCRSSPSTSASIVRTYSSGTEVQIQCQTTGTSTVQGSNVWDKTQHGCYV
ADYYVKTGHSIFTTKCGSSSGGCKPPPINAATVALIKEFEGFVPKPAPDPIGLPTVGY
GHLCKTKGCKEVPYSFPLTQETATKLLQSDIKTFTSCVSNYVKDSVKLNDNQYGALAS
WAFNVGCGNVQTSSLIKRLNAGENPNTVAAQELPKWKYAGGKVMPLVRRRNAEVA
LFKKPSSVQAHPK (SEQ ID NO: 4).

Пример 5. Определение мурамидазной активности.

Мурамидазную активность определяли, измеряя уменьшение поглощения/оптической плотности раствора с суспендированными бактериями *Micrococcus lysodeikticus* ATTC No. 4698 (Sigma-Aldrich M3770) или *Exiguobacterium undea* (DSM14481) на длине волны 540 нм.

Получение субстрата - *Micrococcus lysodeikticus*.

Перед использованием бактериальные клетки суспендировали в буферном растворе (цитрат/фосфат; pH 6,5) до концентрации 0,5 мг клеток/мл и измеряли оптическую плотность (OD) на длине волны 540 нм. Доводили концентрацию клеток в суспензии до оптической плотности $OD_{540}=1,0$ и полученную суспензию до использования держали на холоде. Ресуспендированные клетки использовали не позже чем через 4 ч. Получение субстрата - высушенных клеток *Exiguobacterium undae*. Культивировали клетки *E. undae* (DSM14481) в 100 мл среды LB (Fluka 51208, 25 г/л) во встряхиваемых колбах объемом 500 мл при температуре 30°C и перемешивании со скоростью 250 об/мин, в течение ночи. Наутро культуру центрифугировали при температуре 20°C и ускорении 5000 g в течение 10 мин; полученный осадок два раза промывали стерильной водой, очищенной в системе milliQ, и ресуспендировали в такой же воде. Промытые клетки центрифугировали в течение 1 мин со скоростью 13 000 об/мин и насколько возможно отделяли супернатант. Промытые клетки высушивали в вакуумной центрифуге в течение 1 ч, осадок клеток ресуспендировали в буферном растворе (цитрат/фосфат; pH 4, 5 или 6) до оптической плотности OD_{540} нм=1. Турбидиметрическое определение мурамидазной активности.

Содержащий мурамидазу образец, подлежащий анализу, разбавляли буферным раствором цитрат/фосфатом (pH 4, 5 или 6) до концентрации 100-200 мг белка-фермента/л и держали на льду вплоть до использования. В лунки 96-луночного микропланшета (Nunc) вносили по 200 мкл субстрата и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 5 мин в микропланшетном ридере-фотометре VERSAmax (Molecular Devices). По окончании инкубации в каждой ячейке измеряли поглощение на длине волны 540 нм (исходное значение). Добавляли в каждую лунку 20 мкл разбавленного образца с мурамидазой и измеряли изменение поглощения на длине волны 540 нм при температуре 37°C в течение промежутка времени от по меньшей мере 30 мин до 24 ч. В каждой лунке регистрировали поглощение на длине волны 540 нм; мурамидазная активность отражалась в снижении поглощения на длине волны 540 нм. Результаты этого анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Мурамидазная активность, направленная на клетки *Micrococcus lysodeikticus* и *Exiguobacterium undea*, по данным измерения изменений оптической плотности

Мурамидаза	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ¹	<i>Exiguobacterium undae</i> ¹
Мурамидаза GH22 из <i>Gallus gallus</i> (SEQ ID NO: 5)	+++ (pH 6)	+ (pH 6)
Мурамидаза GH24 из <i>Trichophaea saccata</i> (SEQ ID NO: 4)	++ (pH 6)	++ (pH 6)
Мурамидаза GH25 из <i>Acremonium alcalophilum</i> (SEQ ID NO: 1)	+ (pH 4)	+ (pH 5)

¹(-) - эффект отсутствует; (+) - эффект выражен слабо; (++) - эффект выражен умеренно; (+++) - эффект выражен значительно. В скобках указаны значения pH в данном случае анализа в зависимости от субстрата.

Эти данные подтверждают, что все три белка: мурамидаза GH22 из *Gallus gallus*, мурамидаза GH24 из *Trichophaea saccata* и мурамидаза GH25 из *Acremonium alcalophilum* - обладают мурамидазной активностью.

Пример 6. Испытание 1 in vivo на бройлерах.

Материалы и методы.

Испытания проводились на базе биотехнологической компании Poulpharm" (Pontstraat 93, 8551 Хес-терт, Бельгия) соответственно документам VICH GL9 (Международное сотрудничество в области гармонизации технических требований для регистрации ветеринарных лекарственных препаратов, Надлежащая клиническая практика; июнь 2000, вступили в силу в июле 2001) В эксперименте использовали сам-

цов цыплят-бройлеров возрастом 1 сутки (порода ROSS 308), предоставленных товарной инкубаторной станцией (Broeierij Vergaеke-Belavi, Oude kappellestraat 65, 8700 Тилт, Бельгия).

Животные и их содержание.

В день поступления (День 1) цыплят разделяли случайным образом на группы по 30 особей. Каждую группу помещали в загон для напольного содержания с подстилкой из деревянной стружки и подвергали тому или иному воздействию.

Каждое воздействие повторяли в 12 группах. Птиц содержали в помещении с контролем окружающей среды. В помещении было искусственное освещение: на потолке имелись термолюминисцентные лампы, расположенные на равном расстоянии друг от друга. Температура и относительная влажность устанавливались соответственно возрасту птиц.

Кормление и воздействие.

Основу экспериментальных кормов (стартового корма и корма на ростовой период) составляли кукуруза, пшеница и соевый шротом (главные ингредиенты; см. табл. 3). Стартовый корм содержал 209,8 г сырого белка и 12,2 МДж/кг обменной энергии с поправкой на баланс азота; корм на ростовой период содержал 190,9 г сырого белка и 12,53 МДж/кг обменной энергии с поправкой на баланс азота. Основные корма не содержали кокцидиостатиков.

Таблица 3

Состав и питательная ценность экспериментальных основных кормов

Ингредиенты (г/кг)	Стартовый период (дни с 1-го по 22-й)	Ростовой период (дни с 22-го по 36-й)
Кукуруза	357,15	263,50
Пшеница	250,00	400,00
Соевый шрот	308,00	245,00
Животный жир (лярд)	0,00	20,00
Соевое масло	42,50	34,00
Премикс ¹	5,00	5,00
Известковая пушонка	15,20	12,40
Монокальцийфосфат [Ca(H ₂ PO ₄) ₂]	13,50	8,70
Соль	2,30	1,80
NaHCO ₃	2,30	2,40
L-лизин х HCl	1,50	2,95
DL-метионин	2,10	2,35
L-треонин	0,45	1,10
L-валин	0,00	1,80
Расчетное содержание		
Сырой белок (г/кг)	209,8	190,9
Обменная энергия (МДж/кг) ²	12,20	12,53

¹ Премикс витаминно-минеральный дает на 1 кг корма 10 000 МЕ витамина А, 40 МЕ витамина Е; 3,0 мг витамина К₃; 100 мг витамина С; 2,50 мг витамина В₁; 8,00 мг витамина В₂; 5,00 мг витамина В₆; 0,03 мг витамина В₁₂; 50,0 мг ниацина; 12,0 мг пантотената кальция; 1,50 мг фолиевой кислоты; 0,15 мг биотина; 450 мг холина; 54 мг этоксилина (сантохина); Na - 1,17 г; Mg - 0,8; Mn - 80 мг; Fe - 60 мг; Cu - 30 мг; Zn - 54 мг; I - 1,24 мг; Co - 0,6 мг; Se - 0,3 мг.

² Без кокцидиостатика.

² Рассчитано по уравнению энергосодержания.

Животным давали корм либо без мурамидазы либо с добавкой мурамидазы GH25 (SEQ ID NO: 1) (активность 65 5000 LSU(F)/г), как указано в табл. 4:

Таблица 4

Схема кормления

Группа	Описание	Дозировка (LSU/кг корма)
T1	Отрицательный контроль (NC)	-
T2	Малая доза мурамидазы	25 000
T3	Рекомендуемая доза мурамидазы	35 000
T4	Высокая доза мурамидазы	45 000

Определяемые параметры и аналитические методы.

В течение всего эксперимента начиная с 1-го дня (D1) и по 36-й день (D36) каждую особь по меньшей мере один раз в сутки тщательно осматривали опытные специалисты в области птицеводства, следя за состоянием здоровья.

На 16-й день (D16), 23-й (D23) и 36-й (D36) определяли относительную влажность помета в трех местах подстилки с помощью влагомера.

В последнюю неделю эксперимента у всех птиц определяли признаки пододерматита, оценивая выраженность заболевания в баллах от 0 до 2 согласно протоколу оценки качества для домашней птицы (2009 г.; <http://www.welfarequality.net/network/45848/7/0/40>):

0 - отсутствие даже малых поверхностных повреждений,

1 - заметное изменение окраски подушечек пальцев, поверхностные повреждения, темные бугорки,

2 - значительные изъязвления или коричневые корочки, отек, кровоточащие участки на подушечках лап.

Степень тяжести поражений подушечек лап у птиц выражали показателем FPS (сумма баллов на загон). Этот показатель рассчитывали следующим образом: $100\% \times ((0,5 \times \text{общее количество особей с оценкой 1}) + (2 \times \text{общее количество особей с оценкой 2})) / \text{общее количество осматриваемых особей}$. Для всех особей FPS может быть в пределах от 0 (ни у одной птицы нет поражений) до 200 (у всех птиц пододерматит с оценкой 2). Для каждого загона к данным FPS применяли линейную регрессионную модель (функция lm в R).

Результаты и обсуждение.

Данные по относительной влажности помета в указанные дни эксперимента в различных по экспериментальному воздействию группах птиц представлены в табл. 5.

Таблица 5

Группа	D16			D23			D36		
	Среднее	SD	p	Среднее	SD	p	Среднее	SD	p
T1	26	8	Референсное	42	12	Ref,	60	8	Референсное
T2	32	7	0,117	42	10	0,912	53	15	0,078
T3	31	9	0,167	43	9	0,782	51	7	0,027
T4	29	11	0,415	46	12	0,387	52	7	0,072

SD - стандартное отклонение; p - уровень значимости.

На 36-й день относительная влажность помета была значительно ниже в подстилке у тех групп птиц, которые получали с кормом мурамидазу, в группах птиц, получавших малую и высокую дозы мурамидазы, относительная влажность была ниже, чем в группе отрицательного контроля. Эти результаты свидетельствуют, что мурамидаза влияет на влажность помета.

Данные по оценке выраженности пододерматита в различных группах птиц представлены в табл. 6.

Таблица 6

Группа	Среднее значение оценки пододерматита в баллах
T1	17
T2	14
T3	8
T4	11

В группах особей, получавших с кормом мурамидазу, оценка в баллах пораженности пододерматитом в расчете на загон была ниже, чем в группе отрицательного контроля. Самая низкая пораженность пододерматитом наблюдалась в группе особей, получавших высокую дозу мурамидазы.

Заключение.

Результаты, полученные в описанном выше эксперименте, свидетельствуют, что включение мурамидазы в корм для цыплят-бройлеров эффективно снижает влажность помета и пораженность птиц пододерматитом.

Пример 7. Испытание 2 *in vivo* на бройлерах. Материалы и методы.

Этот эксперимент проводили в Научно-исследовательском центре птицеводства (CEIPAv) Национального независимого университета в Мехико (UNAM; Мексика). Среднегодовая температура составляла 16°C, относительная влажность 60%.

В эксперименте использовали 960 самцов цыплят-бройлеров (Ross 308) возрастом 1 сутки. Схема эксперимента: полностью рандомизированный; 4 варианта воздействия, каждый вариант повторяли 8 раз; в загон помещали по 30 особей. У птицы имелся свободный доступ к корму и воде на протяжении всего эксперимента.

В загонах, где содержалась птица, в качестве подстилки использовали свежий дезинфицированный деревянный наполнитель. В первые 5 суток жизни цыплят для кормления использовали кормушки и поилки; устройства ручной подачи корма и поилки колокольного типа использовали до окончания ростового периода. Первоначальный обогрев птиц обеспечивался газовыми обогревателями (по одному обогревателю в каждом загоне). Температура и относительная влажность регистрировали ежедневно с помощью цифровых термогигрометров. Птичник был кирпичный, с боковыми занавесями, отодвигаемыми вручную. Общее пользование оборудованием и уход за птицей были такими же, как на интегрированных фермах в данной местности.

В эксперименте применяли следующие варианты воздействия.

Таблица 7

Группа	Описание	Дозировка (LSU/кг корма)
T1	Отрицательный контроль (NC)	-
T2	Низкая доза мурамидазы	25 000 LSU/кг (309 мг/кг)
T3	Рекомендуемая доза мурамидазы	35 000 LSU/кг (433 мг/кг)
*Ферментативная активность мурамидазы 80 800 LSU(F)/г		

Ферменты. Препарат RONOZYME® HiPhos GT; 100 ppm (торговое название; приобретено с преимущественным правом покупки) входил в состав корма (1000 фитазных единиц (FYU) на 1 кг). Содержание фосфора в экспериментальном корме подбирали соответственно концентрации фитата с соотношением этих ингредиентов Са:Р около 1,5:1,0.

Кокцидиостатики. В период с 1 го по 21-й день никарбазин (125 ppm) и с 22-го по 49-й день салиномицин (60 ppm).

Вакцинация. В возрасте 10 суток вакцина от болезни Ньюкасла (псевдочумы птиц); также вводили одновременно ассоциированную вакцину против болезни Ньюкасла/гриппа подкожно и в виде капель в глаза. В возрасте 28 суток - другая вакцина против болезни Ньюкасла путем выпаивания с водой.

Экспериментальные корма.

Основу экспериментальных кормов: предстартового, стартового, ростового (откормочного) и финишного - составляли сорго, соевый шрот и сухая зерновая барда с гидролизатами (DDGS). Корма готовили согласно составам, приведенным в табл. 8.

Таблица 8

Состав экспериментальных кормов (кг/т)

Ингредиенты	Корма			
	Предстартовый	Стартовый	Ростовой (откормочный)	Финишный
Сорго 11,17%	608	628	609	662
Соя 48,17%	234	181	180	125
DDGS с низким содержанием жиров	50	80	80	80
Рапс *36,56%	50	50	50	50
Соевое масло	17	26	45	46
Премикс	41	35	36	37
Всего	1 000	1 000	1 000	1 000

Рапс*36,56% - рапс канадских ортов с пониженным содержанием эруковой кислоты (канола), маслячность семян 36,56%.

DDGS - сухая зерновая барда с гидролизатами.

Предстартовый премикс D1-7	T1	T2	T3
Известняк	338,45	338,45	338,45
MDCP	223,84	223,84	223,84
Лизин х HCl	98,52	98,52	98,52
NaHCO ₃	81,32	81,32	81,32
ROVIMIX pollo 0312	69,77	69,77	69,77
DL-метионин	75,33	75,33	75,33
Соль	39,55	39,55	39,55
Треонин	25,86	25,86	25,86
Никармикс 25%	11,63	11,63	11,63
Cosistac 12%	0,00	0,00	0,00
RONOZYME HIPHOS GT broil	2,33	2,33	2,33
FLORAFIL 30 г	0,00	0,00	0,00
Карофилл красный	0,00	0,00	0,00
Энрадин F 80	0,00	0,00	0,00

Sipernat	32,21	32,21	32,21
Всего	1 000	1 000	1 000

Стартовый премикс D8-21	T1	T2	T3
Известняк	287,30	287,30	287,30
МДСР	220,61	220,61	220,61
Лизин х HCl	124,83	124,83	124,83
NaHCO ₃	97,12	97,12	97,12
ROVIMIX pollo 0312	83,33	83,33	83,33
DL-метионин	78,28	78,28	78,28
Соль	40,83	40,83	40,83
Треонин	29,38	29,38	29,38
Никармикс 25%	13,89	13,89	13,89
Cosistac 12%	0,00	0,00	0,00
RONOZYME	2,78	2,78	2,78
НIPHOS GT broil			
FLORAFIL 30 г	0,00	0,00	0,00
Карофилл красный	0,00	0,00	0,00
Энрадин F 80	0,00	0,00	0,00
Sipernat	21,65	21,65	21,65
Всего	1000	1000	1000

Стартовый премикс D22-35	T1	T2	T3
Известняк	334,54	309,13	309,13
МДСР	184,08	170,35	170,35
Лизин х HCl	98,41	90,28	90,28
NaHCO ₃	87,30	80,27	80,27
ROVIMIX pollo 0312	81,08	75,00	75,00
DL-метионин	62,90	58,26	58,26
Соль	37,94	35,48	35,48
Треонин	22,09	20,32	20,32
Никармикс 25%	0,00	0,00	0,00
Cosistac 12%	13,51	12,50	12,50
RONOZYME	2,71	2,50	2,50
НIPHOS GT broil			
FLORAFIL 30 г	54,05	112,50	112,50
Карофилл красный	1,08	1,25	1,25
Энрадин F 80	0,00	0,00	0,00
Sipernat	20,31	31,98	31,98
Всего	1000	1000	1000

Стартовый премикс D36-49	T1	T2	T3
Известняк	332,67	307,04	307,04
MDCP	141,75	131,24	131,24
Лизин х HCl	104,56	96,85	96,85
NaHCO ₃	91,67	84,62	84,62
ROVIMIX pollo 0312	83,33	76,92	76,92
DL-метионин	59,25	55,11	55,11
Соль	37,78	34,94	34,94
Треонин	23,29	21,89	21,89
Никармикс 25%	0,00	0,00	0,00
Cosistac 12%	13,89	12,82	12,82
RONOZYME HIPHOS GT broil	2,78	2,57	2,57
FLORAFIL 30 г	83,33	1533,85	1533,85
Карофилл красный	1,11	1,54	1,54
Энрадин F 80	0,00	0,00	0,00
Sipernat	24,58	20,62	20,62
Всего	1 000	1 000	1 000

MDCP - Ca(H₂PO₄)₂·H₂O+CaHPO₄·2H₂O.

Cosistac - салиномицин.

FLORAFIL - экстракт красного чили (*Capsicum annuum*) + экстракт цветков бархатцев мелкоцветных (*Tagetes erecta*), омыленный, стабилизированный и смешанный с инертным носителем.

Sipernat - диоксид кремния высокодисперсный, осажденный.

Условия хранения кормов. Корм каждой фазы готовили за неделю до использования и держали при комнатной температуре. В течение всего времени хранения температура контролировалась (18°C).

Добавление испытываемых продуктов. Приготовление корма заканчивалось тем, что в каждый вариант премикса добавляли нужное количество мурамидазы (309 г/т и 433 г/т; см. табл. 7); полученный премикс добавляли к остальным ингредиентам согласно табл. 8.

Измерения и анализы.

Пододерматит. Оценку пораженности пододерматитом проводили у цыплят-бройлеров на 35-й и 49-й дни жизни (в Мексике бройлеров продают именно в этом возрасте). Всех птиц в каждом загоне оценивали в соответствии со стандартным протоколом DSM на основании оценок по балльной шкале Welfare Quality®, 2009. Шкала 0-4: А - нет признаков пододерматита (оценка 0); В - минимальные признаки пододерматита (оценки 1 и 2); С - явные признаки пододерматита (оценки 3 и 4).

Анализ экскрементов. В каждом загоне на 49-й день жизни особей брали образцы в четырех разных точках (потом их объединяли), избегая участки, где птицы пили и ели. Анализы проводили в лаборатории питания животных факультета ветеринарии и зоотехники Независимого университета в Мехико (FMVZ-UNAM; Мексика).

1. Сухое вещество, общий азот, влажность. - Собранные образцы сразу замораживали и хранили в морозильнике до отправки в лабораторию.

2. Аммиачный азот. - Собранные образцы сразу охлаждали и хранили в холодильнике до отправки в лабораторию.

Результаты и обсуждение.

У бройлеров пододерматит приводит к некротическому поражению подушечек лап (Shepherd E.M., Fairchild B.D., 2010). Помимо этого, пододерматит снижает рыночную стоимость куриных ножек, а также считается показателем неблагополучного состояния птицы из-за его связи с влажным пометом и перенаселенностью птичника. Данные по оценке пораженности пододерматитом приведены в табл. 9. В группе отрицательного контроля оценки пораженности птицы пододерматитом в возрасте 35 и 49 дней были весьма высокими (P<0.001) по сравнению с группами, в которых особи получали с кормом мурамидазу, что свидетельствовало об эффективности воздействия по данному изобретению для снижения пораженности животных пододерматитом.

Таблица 9

Пораженность пододерматитом бройлеров на 35-й и 49-й дни жизни

Группа	D35	D49
Отрицательный контроль	0,316 ± 0,7	0,468 ± 0,88
Мурамидаза в низкой дозе	0,141 ± 0,6	0,357 ± 0,72
Мурамидаза в высокой дозе	0,004 ± 0,06	0,302 ± 0,76

Также результаты лабораторных анализов экскрементов (аммиачный и общий азот; см. табл. 10) показывают, что при включении в корм мурамидазы в высокой дозе уровень общего азота весьма низкий. Этот факт согласуется с тем, что при таком корме оценка пораженности пододерматитом самая низкая, поскольку снижено содержание азота в помете (Shepherd E.M., Fairchild B.D., 2010).

Таблица 10

Показатели помета на 34-й день жизни бройлеров

Группа	Аммиачный азот	pH
Отрицательный контроль	0,064 ± 0,006	6,24 ± 0,07
Мурамидаза в низкой дозе	0,041 ± 0,006	6,13 ± 0,07
Мурамидаза в высокой дозе	0,025 ± 0,006	0,14 ± 0,07

Выводы.

Результаты описанного выше исследования свидетельствуют, что включение микробной мурамидазы в корм цыплят-бройлеров эффективно снижает пораженность птицы пододерматитом и уменьшает содержание аммиачного азота и pH помета.

Объем данного изобретения согласно приведенному выше описанию и прилагаемой формуле изобретения не ограничивается конкретными вариантами, описанными в настоящем документе, поскольку эти варианты представлены в качестве иллюстрации ряда аспектов данного изобретения. Подразумевается, что любые эквивалентные варианты входят в объем данного изобретения. Специалистам в данной области техники из настоящего описания должны быть очевидны различные модификации данного изобретения помимо изложенных в настоящем документе. Такие модификации также входят в объем данного изобретения, очерченный его формулой. Возможные разногласия могут быть урегулированы исходя из настоящего описания, включая определения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения качества помета и вследствие этого снижения пораженности пододерматитом у животных с однокамерным желудком, включающий введение этим животным в составе композиции корма или кормовой добавки одной или более микробных GH25 мурамидаз.

2. Способ по п.1, в котором под улучшением качества помета понимают уменьшение влажности помета, уменьшение содержания аммиачного азота в помете и/или снижение уровня pH помета.

3. Способ по п.1, в котором животное с однокамерным желудком выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок; кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят.

4. Способ по п.1 или 2, в котором микробную мурамидазу получают из представителей типа *Ascotusota* или подтипа *Pezizomycotina*.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором микробную мурамидазу выбирают из группы, состоящей из:

(a) полипептида, который по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 86, по меньшей мере на 87, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 89, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 91, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 93, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99 или на 100%, идентичен последовательности SEQ ID NO: 1;

(b) варианта последовательности SEQ ID NO: 1, который обладает мурамидазной активностью и содержит одну или более аминокислотных замен, и/или одну или более делеций, и/или одну или более вставок или любую комбинацию указанных изменений аминокислотной последовательности в 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениях полипептидной цепи;

(с) фрагмента полипептида по п.(а) или (b), который обладает мурамидазной активностью и содержит по меньшей мере 170 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 175 аминокислотных остатков, по меньшей мере 177 аминокислотных остатков, по меньшей мере 180 аминокислотных остатков, по меньшей мере 185 аминокислотных остатков, по меньшей мере 190 аминокислотных остатков, по меньшей мере 195 аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 аминокислотных остатков.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором микробную мурамидазу выбирают из группы, состоящей из аминокислотной последовательности с 1-го по 213-е положения последовательности SEQ ID NO: 1 и аминокислотной последовательности с 1-го по 208-е положения последовательности SEQ ID NO: 10.

