



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 290 798 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 23 K 1/165

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 23 K / 335 269 1
(31) P3841152.0

(22) 05. 12. 89
(32) 07. 12. 88

(44) 13. 06. 91
(33) DE

(71) siehe (73)

(72) Lotz, Andreas, Dr.; Pries, Hans-Dieter, Dr.; Wöhner, Gerhard, Dr. Scheuermann, Stefan E., Dr., DE

(73) HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, W - 6230 Frankfurt am Main 80, DE

(54) Verwendung von bakterienlysierendem Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sowie dessen Mutanten und Varianten sowie Futtermittel

(55) bakterienlysierendes Enzymprodukt; *Streptomyces coelicolor* DSM 3030; Tierfutterzusatzstoff; Futtermittelverwertung, verbessert; Tierwachstum, gesteigert

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung von bakterienlysierendem Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sowie dessen Mutanten und Varianten sowie Futtermittel, durch die eine Verbesserung der Futtermittelverwertung hervorgerufen wird, die sich in einem besseren Wachstum der Tiere äußert.

Patentansprüche:

1. Verwendung von bakterienlysierendem Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM3030 sowie dessen Mutanten und Varianten, dadurch gekennzeichnet, daß es als Zusatzstoff zu Tierfutter eingesetzt wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das bakterienlysierende Enzymprodukt in Form des getrockneten Nährmediums eingesetzt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das bakterienlysierende Enzymprodukt mit einer N-Acetylmuramidase-Aktivität von 0,1 bis 1000 U/mg Futtermittel in diesem enthalten ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität 0,5 bis 5 U/mg beträgt.
5. Futtermittel, dadurch gekennzeichnet, daß es ein bakterienlysierendes Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 als Zusatzstoff enthält.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Bakterienlysierendes Enzymprodukt und Protease werden als Zusatzstoff zur Verbesserung der Futterverwertung in der Tierproduktion verwendet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Verwendung von Zusatzstoffen im Tierfutter zur Verbesserung der Futterverwertung ist bekannt. Bei diesen Leistungsförderern handelt es sich vorwiegend um antibakteriell wirksame Substanzen, wie beispielsweise das Flavomycin®, ein Gemisch aus verschiedenen Phosphoglykolipid-Antibiotika, den Moenomycinen, dessen Verwendung als Futterzusatzstoff in dem Deutschen Patent 1203107 beschrieben wird.

Gemäß WO 8904-320 wird ein tierisches Lysozym mit Hilfe eines genetisch veränderten Mikroorganismus hergestellt. Ein derartiges Lysozym kann als Futterzusatzmittel für Wiederkäuer zur Verbesserung der Gewichtszunahme eingesetzt werden. In SU 1397-019 wird ein Gemisch aus Lysozym und Zitronensäuren bzw. Essigsäure als Wachstumsstimulator für Tiere beschrieben.

Ziel der Erfindung

Die Zugabe des bakterienlysierenden Enzymprodukts oder des Gemisches zu den Futtermitteln bewirkt deren wesentlich bessere Verwertung und damit verbunden ein besseres Wachstum der Tiere. Ihre Verwendung als Zusatzstoff zu Futtermitteln hat, im Vergleich zu den antibiotisch wirkenden Zusatzstoffen, den großen Vorteil, daß bei Anwendung über einen längeren Zeitraum die Gefahr einer Resistenzbildung nicht vorhanden ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Futterzusatzstoffe aufzufinden, die eine bessere Futterverwertung von Tieren ermöglichen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Verwendung von bakterienlysierendem Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sowie dessen Mutanten und Varianten, die das Enzymprodukt ebenfalls produzieren, als Futterzusatzmittel vorteilhaft ist. Ebenso kann ein Gemisch aus bakterienlysierendem Enzymprodukt und Protease in Futtermitteln mit sehr guten Ergebnissen bei der Gewichtszunahme und der Futterverwertung von Tieren verwendet werden.

Die Erfindung betrifft somit:

1. Die Verwendung von bakterienlysierendem Enzymprodukt aus *Streptomyces coelicolor* DSM3030 sowie dessen Mutanten und Varianten als Zusatzstoff zu Tierfutter.
2. Die Verwendung eines Gemisches von bakterienlysierendem Enzymprodukt mit N-Acetylmuramidase Aktivität und Protease als Zusatzstoff zu Tierfutter.
3. Futtermittel, das das unter 1. bzw. 2. charakterisierte Produkt als Zusatzstoff enthält.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert erläutert, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche definiert.

Das Enzymprodukt mit N-Acetylmuramidase-Aktivität aus DSM3030 kann sowohl in reiner Form oder auch mit anderen Stoffen versetzt, beispielsweise mit Fermentationsrückständen oder Proteinen, eingesetzt werden. Die Gewinnung dieses Enzymprodukts aus *Streptomyces coelicolor* DSM3030 sowie dessen Charakterisierung ist ausführlich in der Deutschen Offenlegungsschrift 3440735 beschrieben.

Streptomyces coelicolor DSM3030 wird beispielsweise in einem Nährmedium gezüchtet, das Zuckerrübenmelasse in einer Menge von 5 bis 50 g, vorzugsweise 10 bis 20 g, pro Liter Kulturmedium enthält. Wenn dem Medium Calciumionen in Form leicht löslicher, ungiftiger Calciumsalze zugegeben werden, so kann die Ausbeute weiter gesteigert werden. Vorteilhaft ist eine 0,05 bis 1 molare Calciumkonzentration.

Das Enzymprodukt wird in das Kulturmedium ausgeschieden. Das Enzym mit N-Acetylmuramidaseaktivität kann nach an sich bekannten Methoden aus diesem Medium, beispielsweise durch Fällung oder Extraktion, aufgereinigt gewonnen werden. Es ist jedoch nicht unbedingt notwendig, den Fermentationsüberstand zur Gewinnung des bakterienlyserenden Enzymprodukts aufzuarbeiten, sondern es ist ausreichend, ihn als getrocknetes Produkt direkt dem Futter zuzusetzen. Die Trocknung des Fermentationsüberstands erfolgt bevorzugt durch Sprühtrocknung.

Ein derartig hergestelltes bakterienlyserendes Enzymprodukt ist jedoch mit Proteasen vergesellschaftet. Um das reine Enzymprodukt zu erhalten, kann eine Reinigung mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie an schwach sauren, makroporösen Kationenaustauschern erfolgen. Ein entsprechendes Verfahren ist in der Europäischen Patentanmeldung 280032 beschrieben.

Das erhaltene bakterienlyserende Enzymprodukt ist in bezug auf seine lytische Aktivität in einem pH-Bereich von unter 3 bis 9 stabil und wirksam. Nach 16 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in Puffergemischen war die maximale Aktivität im Bereich von pH 3 bis 9 noch zu mindestens 80% erhalten.

Das Temperatur-Optimum für die Aktivität des bakterienlyserenden Enzymprodukts liegt im Bereich von 50 bis 60°C. Über diesen Bereich werden mindestens 90% der maximalen Aktivität erreicht. Von niedrigen Temperaturen ausgehend steigt die Aktivität mit steigender Temperatur bis 60°C langsam an; bei Zimmertemperatur sind es etwa 10%, bei 30°C etwa 30%, bei 40°C etwa 60% der maximalen Aktivität. Bei höheren Temperaturen fällt die Aktivität rasch ab: bei 65°C sind es noch etwa 30%, bei 70°C 10% der maximalen Aktivität.

Es kann auch ein bakterienlyserendes Enzymprodukt im Gemisch mit Proteasen eingesetzt werden. Dabei kann grundsätzlich jedes bakterienlyserende Enzymprodukt mit N-Acetylmuramidase-Aktivität erfindungsgemäß Anwendung finden. Ein derartiges Enzymprodukt besteht hauptsächlich aus einem oder mehreren Enzymen mit N-Acetylmuramidase-Aktivität, wobei diese Enzyme jedoch durchaus auch mit anderen Stoffen, beispielsweise Fermentationsrückständen, versetzt sein können. Das Enzymprodukt kann aus pflanzlichem oder tierischem Gewebe gewonnen werden oder von mikrobiellem Ursprung sein.

Besonders geeignet ist ein aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sowie ein aus dessen Varianten und Mutanten gewonnenes bakterienlyserendes Enzymprodukt. Bei den Proteasen handelt es sich vor allem um trypsin- bzw. chymotrypsinähnliche Enzyme. Die Verwendung des proteasehaltigen Enzymgemisches ist von Vorteil, da mit diesen Produkten bessere Ergebnisse bei der Futterverwertung erzielt werden. Das Verhältnis bakterienlyserendes Enzymprodukt zu Protease sollte im Bereich von 1:1 bis 1000:1, vorteilhaft im Bereich von 100:1 bis 500:1, bezogen auf die Enzymaktivität, liegen.

Das bakterienlyserende Enzymprodukt von DSM 3030 sowie das soeben beschriebene Enzymgemisch kann grundsätzlich allen Futtermitteln zugegeben werden. Bevorzugt geeignet sind beispielsweise solche, die mit den Vorschriften der Futtermittelgesetzgebung übereinstimmen, wie Alleinfutter, Ergänzungsfutter und Mineralfutter.

Das bakterienlyserende Enzymprodukt kann im Bereich von 0,1 bis 100000 ppm zugesetzt werden, vorzugsweise im Bereich von 1 bis 1000 ppm. Die lytische Aktivität von bakterienlyserendem Enzymprodukt wird üblicherweise in Units (U) angegeben. Die Messung der N-Acetylmuramidase-Aktivität erfolgt wie in der Deutschen Offenlegungsschrift 3440735 beschrieben. Sie soll im Futter zweckmäßig zwischen 0,1 bis 100 U/mg Futter liegen, vorzugsweise zwischen 0,5 und 50 U/mg.

Das Enzymprodukt einzeln oder im Gemisch wird dem Futter in entsprechenden Gewichtsverhältnissen chargenweise untergemischt. Wichtig ist hierbei eine gleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe im Futter.

Futtermittel, die bakterienlyserendes Enzymprodukt aus DSM 3030 bzw. das Gemisch aus bakterienlyserendem Enzymprodukt und Protease enthalten, können zur Fütterung sämtlicher Tiere, besonders vorteilhaft aber zur Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere zur Nahrungsmittelproduktion, insbesondere Bröiler, Puten, Schweine und Rinder, eingesetzt werden.

Die Zugabe des bakterienlyserenden Enzymprodukts oder des Gemisches zu den Futtermitteln bewirkt deren wesentlich bessere Verwertung und damit verbunden ein besseres Wachstum der Tiere. Ihre Verwendung als Zusatzstoff zu Futtermitteln hat, im Vergleich zu den antibiotisch wirkenden Zusatzstoffen, den großen Vorteil, daß bei Anwendung über einen längeren Zeitraum die Gefahr einer Resistenzbildung nicht vorhanden ist.

Ausführungsbeispiele

Im folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen weitergehend erläutert werden.

Beispiel 1:

Kultivierung von *S. coelicolor* DSM 3030

Schrägboden-Agarmedium, welches 2% Sojamehl, 2% Mannit und 1,5% Agar (pH 7,5) enthielt, wurde mit *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 beimpft und 10 Tage bei 30°C kultiviert. Die Schrägkultur wurde mit 10 ml einer sterilen Lösung von 0,9% NaCl und 0,01% eines nichtionischen Tensids versetzt und die Sporen abgeschwemmt. 0,2 ml der Sporensuspension wurden als Impfmateriale für Schüttelkulturen von 100 ml Kulturmedium in 300 ml fassenden Kulturkolben verwendet.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Kulturmedien Nr. 1-3 wurden angesetzt, beimpft und bei 30°C und einer Frequenz von 160 Upm geschüttelt. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und die Aktivität des bakterienlyserenden Enzymprodukts im Kulturüberstand bestimmt (Tabelle 2).

Die höchsten Ausbeuten an bakterienlyserendem Enzymprodukt wurden mit der Nährlösung 3 erhalten, die neben Glucose, Sojamehl und Caseinpepton 2% Zuckerrübenmelasse enthielt.

Tabelle 1
Kulturmedien

%	Medium Nr.		
	1	2	3
Glucose	2		1
Mannit		2	
Sojamehl	2	1	0,5
Caseinpepton			0,5
Melasse		1	2

Tabelle 2:
Aktivität an bakterienlysierendem Enzymprodukt im Kulturüberstand (U/ml)

Fermentationszeit Tage	Medium Nr.		
	1	2	3
2	21	15	363
4	367	378	1 106
6	236	558	2 088

Beispiel 2:

Ausbeuteerhöhung durch Calciumzusatz

Streptomyces coelicolor DSM 3030 wurde in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise auf einem Nährboden, der 1% Glucose, 2% Melasse, 0,5% Sojamehl, 0,5% Caseinpepton und 0,5% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ enthält, kultiviert. Durch den Zusatz von CaCl_2 wurde eine wesentliche Erhöhung der Ausbeute an bakterienlysierendem Enzymprodukt im Kulturüberstand nach 2, 4 und 6 Tagen von 768 U/ml, 2462 U/ml und 4715 U/ml erhalten.

Beispiel 3:

a) Aktivitätsbestimmung von bakterienlysierendem Enzymprodukt:

Zu 2,8 ml einer Suspension von 0,2 mg *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (Boehringer Mannheim) pro ml 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) werden 0,2 ml bakterienlysierendes Enzymprodukt-haltige Proben pipettiert und bei 25°C die Abnahme der Trübung durch Messung der Extinktion bei 450 nm bestimmt. Als 1 U wird die Extinktionsabnahme von 0,001 Photometer-Skalaeinheiten pro Minute definiert.

b) Aktivitätsbestimmung von Protease mit Azocasein:

Ausgangsmaterial:

Puffer: 0,1 M Na-phosphatpuffer (pH 7,0)

Azocaseinlösung: 250 mg Azocasein + 10 ml Puffer – rühren bis sich kein Azocasein mehr löst; nicht gelöstes Azocasein abzentrifugieren und den Überstand für den Test einsetzen.

Durchführung:

in 15 ml Glaszentrifugenröhrchen pipettieren

Probe Leerwert
– 2 ml Probe – 2 ml Probe
 – 0,5 ml Puffer zugeben

– bei +40°C im Wasserbad 5 min vorwärmen

+ 0,5 ml Azocas.-lsg (40°C) zugeben

– mischen

– 30 min Inkubation +40°C im Wasserbad + 0,2 ml Perchlorsäure 70%ig zugeben (Reaktionsstop)

– mischen

– 5 min bei Raumtemperatur stehenlassen

– ausgefälltes Casein abzentrifugieren

– photometrische Bestimmung der Überstände (E_{440})

0-Wert: an Stelle der Probe wird Puffer in den Test eingesetzt

Der 0-Wert sollte (E_{440}) 0,050–0,060 betragen.

Berechnung

$$1 \text{ U}_{\text{Azoc.}}/\text{ml} \triangleq \frac{\Delta E \cdot 0,001}{\text{min}} \triangleq \frac{(\Delta E - 0\text{-Wert}) \times 1000}{30} \times \text{Verdünnung}$$

Beispiel 4:

6 Monate-Versuch mit Mastbullen

In einem 6-Monate-Versuch mit Mastbullen erhielten Gruppen von je 9 Tieren Dosierungen von 100 ppm bzw. 200 ppm Enzymprodukt pro Tier und Tag (erhalten durch Trocknung des Kultivierungsüberstandes nach Abtrennung der Zellen von *Streptomyces coelicolor* DSM 3030) pro kg Ergänzungsfutter, was einer Enzymgemisch-Dosierung von durchschnittlich 326 mg bzw. 454 mg pro Tier und Tag entspricht. Neben der präparatbedingten Verbesserung des Wachstums und der Futterverwertung ergaben sich bei den behandelten Tieren keine auffälligen Befunde.

Beispiel 5:**Versuch mit Ratten**

Ratten im Gewichtsabschnitt 65–180 kg Lebendmasse erhielten ein standardisiertes Rattenfutter (Altromin[®] Nr. 3121 Altromin International, Lage Lippe, BR Deutschland), das dem Bedarf wachsender Ratten angepaßt war. Pro Behandlung wurden 6 Tieren eingesetzt und auf die Gruppen „Kontrolle“ (ohne Zusätze), Testgruppe I (19 U Lysozym/mg Futter) und Testgruppe II (38 U Lysozym/mg Futter) verteilt. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten.

Die Futteraufnahme wurde täglich, das Gewicht wöchentlich jeweils pro Tier registriert. Einer 14tägigen Fütterungsphase folgte eine 7tägige Stickstoffbilanzperiode mit einer quantitativen Sammlung von Kot und Harn.

Aus der Differenz zwischen der Aufnahme an Stickstoff über das Futter und den Stickstoffausscheidungen über Kot und Harn wurde die Stickstoffretention als Maß für den Proteinansatz berechnet.

Ergebnis (Tabelle 1):

Die Gewichtsentwicklung der Testgruppe I und II waren um 4,2 bzw. 3,1 % erhöht, und der Futterverbrauch um durchschnittlich 3,3% vermindert. Die Stickstoffretention war um durchschnittlich 28,5 bzw. 25,2% verbessert.

Beispiel 6:**Versuch mit Ferkeln**

Ferkel im Gewichtsabschnitt 15–25 kg Lebendmasse erhielten eine Futtermischung auf Getreide-Soja und Fischmehlbasis, die bedarfsgerecht mit Vitaminen, Spuren- und Mengenelementen ergänzt war (Tab. 3). Die Kontrollgruppe (n = 10) bzw. Testgruppe (n = 7) erhielt das Futter ohne bzw. mit einem Zusatz von 10 U Lysozym-Aktivität/mg Futter.

Die Futteraufnahme wurde pro Mahlzeit (2/Tag) und die Gewichtsentwicklung wöchentlich registriert. Die täglichen Zunahmen (g/d) und der Futteraufwand (kg Futter/kg Zuwachs) wurden am Ende des Versuchs berechnet.

Ergebnis (Tabelle 2):

Die Gewichtsentwicklung wurde durch den Zusatz um durchschnittlich 4,7% verbessert und der Futteraufwand um durchschnittlich 8,5% reduziert.

Tabelle 1

Wirkung von Lysozym/Protease-Kombination bei Ratten

Gruppe	Aktivität		tägl. Zunahmen g/d	Futterverwertung	Stickstoffretention g/d
	Lysozym U/mg Futter (Feed)	Protease			
Kontrolle			5,46 ±0,016 100,0	3,04 ±0,09 100,0	0,151 ±0,010 100,0
I	19	0,04	5,69 ±0,18 104,2	2,94 ±0,12 96,7	0,194 ±0,016 128,5
II	38	0,08	5,63 ±0,13 103,1	2,94 ±0,09 96,7	0,189 ±0,008 125,2
p*			≤0,05	0,05	0,001

* Irrtumswahrscheinlichkeit

Tabelle 2

Wirkung von Lysozym/Protease-Kombination bei Ferkeln

	Aktivität		tägl. Zunahmen g/d	Futterverwertung
	Lysozym U/mg Futter (Feed)	Protease		
Kontrolle			400,7 ±77,3 100,0	1,89 ±0,30 100,0
10		6,7 · 10 ⁻⁶	419,5 ±61,2 104,7	1,73 ±0,20 91,5

Tabelle 3

Futterzusammensetzung in %

Gerste	20,0
Weizen	10,0
Hafer	6,0
Mais	25,2
Leinkuchen	5,5
Luzernegrünmehl	4,0
Sojaextraktionsschrot	18,0
Fischmehl	4,0
Weizenkleie	5,0
Vitamine und Mineralstoffmischung	2,3