

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**206 447 B**

(21) A bejelentés száma: 6443/89  
(22) A bejelentés napja: 1989. 12. 06.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
P 38 41 152 1988. 12. 07. DE

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**A 23 K 1/16**

**C 12 N 9/52**

(40) A közzététel napja: 1991. 06. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 11. 30. SZKV 92/11

(72) Feltalálók:

dr. Lotz, Andreas, Frankfurt/Main (DE)  
dr. Pries, Hans-Dieter, Eching (DE)  
dr. Wöhner, Gerhard, Wunstorf (DE)  
dr. Scheuermann, Stefan Eugen, Hünstetten (DE)

(73) Szabadalmaz:

Hoechst Ag., Frankfurt/Main (DE)

(54) **Eljárás állatok tömeggyarapodásának fokozására  
és takarmányhasznosításának javítására baktériumlizáló enzimek és proteázok  
alkalmazásával, valamint eljárás az erre szolgáló takarmányok előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány szerint állati takarmányokhoz adalék-  
anyagként *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból  
nyert baktériumlizáló enzimeket vagy baktériumlizáló  
enzimek és proteázok keverékét adják, 0,1–1000 E  
enzim/mg takarmány mennyiségben, és az állatokat

ezzel etetik. A találmány tárgya az ilyen takarmányok  
előállítása is.

A találmány szerint előállított termékek takar-  
mányhasznosítást növelő hatása az állatok gyorsabb  
növekedésében nyilvánul meg.

A találmány tárgya eljárás állatok takarmányhasznosításának és tömeggyarapodásának javítására baktériumlizáló enzimek vagy baktériumlizáló enzimek és proteázok alkalmazásával.

Az állatok takarmányozásában ismertek olyan adalékanyagok, amelyeket a takarmányhasznosítás javítása érdekében alkalmaznak. Ezek a hatásfokozók túlnyomórészt antibakteriális hatású anyagok, mint például a flavomicin – ami különböző foszfoglikolipid antibiotikumok keveréke – és a moenomycin. A moenomycin takarmány-adalékanyagként való alkalmazását a 1 203 107 sz. NSZK-beli szabadalmi leírásban ismertetik.

A 89/04320 nemzetközi közzétételi számú szabadalmi leírás szerint állati lizozimet genetikailag módosított mikroorganizmus segítségével állítanak elő. Ilyenfajta lizozimet takarmányadalék formájában kérődzők súlygyarapodásának elősegítésére lehet felhasználni.

A 1 397 019 sz. szovjet szabadalmi leírásban állatok növekedésének gyorsítását előidéző lizozim és citromsav vagy ecetsav keverékét írják le.

A 3 701 835 számú német szövetségi köztársaságbeli közrebocsátási iratban ismertetik a *Streptomyces coelicolor* lizáló enzimjeinek alkalmazását sejt és hús tartósítására. A 63 264 424 számon publikált japán szabadalmi leírásban tartós takarmány előállítására használnak adalékanyagként többek között lizozimet és proteázokat.

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó baktériumlizáló enzimek előnyösen alkalmazhatók takarmány-adalékanyagként, különféle állatok tömeggyarapodásának és takarmányhasznosításának fokozására. Ugyanígy nagyon jó tömeggyarapodási és takarmányhasznosítási eredményre vezet, ha a fenti baktériumlizáló enzimek és proteázok keverékét adjuk a takarmányhoz.

A találmány tárgya:

1. Eljárás állatok takarmányhasznosításának javítására és tömeggyarapodásának fokozására úgy, hogy *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó N-acetilmuramidáz aktivitású baktériumlizáló enzimeket használunk állati takarmányok adalékanyagként.
2. Eljárás állatok takarmányhasznosításának javítására és tömeggyarapodásának fokozására úgy, hogy *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó N-acetilmuramidáz aktivitással rendelkező baktériumlizáló enzimek és proteázok keverékét használjuk állati takarmányok adalékaként.
3. Eljárás az 1., illetve 2. pontban jellemzett enzimeket adalékként tartalmazó, állati tömeggyarapodást fokozó takarmányok előállítására.

A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt, különösen annak előnyös megvalósítási módjait.

A *Str. coelicolor* DSM 3030-ból származó N-

acetilmuramidáz aktivitással rendelkező enzimeket alkalmazhatjuk tisztán, vagy más anyagokkal, például fermentációs maradékokkal vagy proteinekkal együtt. Ezeknek az enzimeknek a kinyerését *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból, valamint az enzimek jellemzését a 3 440 735 sz. NSZK-beli nyilvánossághozozatoli iratban részletesen leírják.

A *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-at például a tenyésztőközeg 1 literében 5–50 g, előnyösen 10–20 g cukorrépa melaszt tartalmazó táptalajon szaporítják. Amennyiben a közeghez könnyen oldódó, nem mérgező kalciumsó formájában kalciumionokat adunk, akkor a kihozatal tovább növelhető. Előnyös a 0,05–1 mól kalcium-koncentráció.

Az enzimek a tenyésztőközegbe kiválnak. Ettől a közegtől önmagában ismert módon, például kicsapás vagy extrakció útján ki lehet nyerni a tisztított, N-acetilmuramidáz aktivitású enzimet. Nem feltétlenül szükséges azonban a fermentáció felülűszójából kinyerni a baktériumlizáló enzimeket, hanem elégséges azt szárított terméként közvetlenül hozzáadni a takarmányhoz. A fermentáció felülűszóját előnyös porlasztva szárítani.

Az ily módon előállított baktériumlizáló enzimek azonban proteázokkal társulnak. Annak érdekében, hogy tiszta enzimet kapjunk, ioncserélő kromatográfias úton tisztítást végezhetünk enyhén savas, nagyporozitású kationcserélőn. Erre megfelelő tisztítási eljárást írnak le a 280 032 sz. európai közrebocsátási iratban.

A kapott baktériumlizáló enzimek litikus aktivitása 3–9 közötti pH-tartományban stabil és hatékony. Az enzim ebben a pH-tartományban legnagyobb aktivitásának még legalább 80%-át megtartja szobahőmérsékleten, pufferkeverékben végzett 16 órás inkubálás után.

A baktériumlizáló enzimek aktivitásának hőmérsékletoptimuma 50–60 °C között van. Az e feletti hőmérséklet-tartományban elérjük a legnagyobb aktivitás legalább 90%-át. Alacsonyabb hőmérsékletekről indulva az aktivitás az emelkedő hőmérséklettel 60 °C-ig lassan növekszik: a legnagyobb aktivitásnak kb. 10%-a szobahőmérsékleten, kb. 30% 30 °C-on, kb. 60%-a 40 °C-on. Magasabb hőmérsékleten az aktivitás gyorsan csökken: a legnagyobb aktivitásnak még kb. 30%-a 65 °C-on, kb. 10%-a 70 °C-on megmarad.

Baktériumlizáló enzimeket proteázokkal keverve is alkalmazhatunk. Emellett a találmány szerinti eljárásban alkalmazva elvileg minden egyes baktériumlizáló enzimnek lehet N-acetilmuramidáz-aktivitása. Ilyenféle enzimek főként egy vagy több N-acetil-muramidáz aktivitással rendelkező enzimből állnak, ezek az enzimek azonban össze lehetnek keverve más anyagokkal, mint például fermentációs maradékokkal is. Az enzimeket növényi vagy állati szövetekből nyerhetjük ki, de lehetnek mikrobiológiai eredetűek is. Különösen alkalmasak a *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-ból, valamint annak variánsaiból és mutánsaiból kinyert baktériumlizáló enzimek. A proteázok esetében mindegyiket a tripszin-, illetve a kimotripszin-féle enzimek jöhetnek szóba. Előnyös proteáztartalmú enzimkeveréket alkalmazni, mert a takarmányhasznosításban ezzel

a termékkel jobb eredmények érhetők el. A baktériumlizáló enzimek és a proteázok közötti arány, enzimaktivitásra vonatkoztatva 1:1–1000:1, előnyösen 100:1–500:1.

A DSM 3030-ból származó baktériumlizáló enzimek, valamint a fentiekben leírt enzimkeverék elvileg valamennyi takarmányhoz hozzákeverhetők. Előnyösek például azok a takarmányok, amelyek megegyeznek a takarmány törvény előírásával, mint például az önmagukban alkalmazható takarmányok, a kiegészítő takarmányok és az ásványi anyagot tartalmazó takarmányok.

A baktériumlizáló enzimeket 0,1–100 000 ppm, előnyösen 1–1000 ppm mennyiségben adagolhatjuk a takarmányhoz. A litikus aktivitást a szokásos módon egységekben (E) adjuk meg. Az N-acetilmuramidáz aktivitást a 3 440 735 sz. NSZK-beli nyilvánossághozzátal iratban leírtak szerint mérjük. Az aktivitás célszerűen 0,1–100 E/mg takarmány, előnyösen 0,5–50 E/mg takarmány.

Az enzimeket egyenként vagy keverékben a súlyviszonyoknak megfelelően szarzszerűen keverjük a takarmányhoz. Fontos a hatóanyag egyenletes eloszlása a takarmányban.

A DSM 3030-ból származó baktériumlizáló enzimeket, illetve baktériumlizáló enzimek és proteázok keverékét tartalmazó takarmányokat valamennyi állat takarmányozására felhasználhatjuk, de különösen előnyös mezőgazdasági használatok, különösképpen broilek, pulykák, sertések és szarvasmarhák takarmányozására.

A baktériumlizáló enzimek vagy a keverék hozzáadása a takarmányhoz jelentősen javítja annak hasznosulását és ezzel együtt fokozza az állatok növekedését. Takarmány-adalékanyagként történő felhasználásuk, az antibiotikus hatású adalékanyagokkal összehasonlítva, azzal a nagy előnnyel jár, hogy nem áll fenn a rezisztencia kialakulásának a veszélye, ha hosszabb időn át alkalmazzuk.

Az alábbiakban példák segítségével szemléltetjük a tálmány szerinti eljárást.

#### 1. példa

*Streptomyces coelicolor* DSM 3030 szaporítása

2% szójalisztet, 2% mannitot és 1,5% agart (pH=7,5) tartalmazó ferdefelületű agart *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 törzsszel beoltunk és 10 napig 30 °C-on szaporítunk. A ferde tenyészetet 10 ml 0,9% NaCl-ot és 0,01% nemionos tenzidet tartalmazó steril oldattal összekeverjük és a spórákat leöntjük. A spóraszuszpenzió 0,2 ml-ét 300 ml ürtartalmú lombikban 100 ml tenyésztőközeget tartalmazó lombiktenyészet oltására használjuk.

Az I. táblázat 1–3. számú tenyésztőközeget egy-egy lombikba helyezük, beoltjuk és 30 °C-on 160 fordulat/perc frekvenciával rázzuk. 2, 4 és 6 nap után mintát veszünk, a sejteket lecentrifugáljuk és meghatározzuk a baktériumlizáló enzimek aktivitását a tenyészetben (II. táblázat).

Baktériumlizáló enzimre nézve a legnagyobb kiho-

zattal a 3. tápoldattal értük el, amely glükóz, szójaliszt és kazeinpepton mellett 2% cukorrépaemlaszt is tartalmazott.

I. táblázat

| Táptalajok<br>% | Tápoldatszám |   |     |
|-----------------|--------------|---|-----|
|                 | 1            | 2 | 3   |
| glükóz          | 2            |   | 1   |
| mannit          |              | 2 |     |
| soójaliszt      | 2            | 1 | 0,5 |
| kazeinpepton    |              |   | 0,5 |
| melasz          |              | 1 | 2   |

II. táblázat

Baktériumlizáló enzimek aktivitása a tenyészetben (E/ml)

| A fermentálás időtartama<br>(nap) | Tápoldatszám |     |      |
|-----------------------------------|--------------|-----|------|
|                                   | 1            | 2   | 3    |
| 2                                 | 21           | 15  | 363  |
| 4                                 | 367          | 378 | 1106 |
| 6                                 | 236          | 558 | 2088 |

#### 2. példa

A kihozatal növelése kalcium adalékkal

Az 1. példában leírtak szerint *Streptomyces coelicolor* DSM 3030-at szaporítunk 1% glükózt, 2% melaszt, 0,5% szójalisztet, 0,5% kazeinpepton és 0,5% CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O-t tartalmazó táptalajon. A CaCl<sub>2</sub> hozzáadása következtében a tenyészetben a baktériumlizáló enzimek kihozatala jelentősen megnőtt, a 2., a 4. és a 6. nap után rendre 758 E/ml, 2462 E/ml és 4715 E/ml volt.

#### 3. példa

a) Baktériumlizáló enzimek aktivitásának (lizozimaktivitás) meghatározása (a 3 440 735 sz. NSZK-beli közrebocsátási irat szerint):

1 ml 0,1 mólos nátrium-acetát pufferben (pH=5,0) 0,2 mg *Mikrococcus luteus* ATCC 4968-at (Boehringer Mannheim) tartalmazó szuszpenzió 2,8 ml-éhez 0,2 ml baktériumlizáló enzimet tartalmazó mintát pipetázunk és 25 °C-on extinkció mérésével 450 nm-nél meghatározzuk a zavarodás csökkenését. A fotométer skálán 0,001 egység/perc extinkció csökkenés 1 egységet (E) jelent.

b) Proteázok aktivitásának meghatározása azokazein-nel:

Kiindulási anyag:

Puffer: 0,1 mól nátrium-foszfát puffer (pH=7,0)

Azokazein oldat: 250 mg azokazein + 10 ml puffer – keverés addig, amíg már több azokazein nem oldódik: a nem oldódó azokazeint lecentrifugálni és a felülúszót a méréshez felhasználni.

**Kivitelezés:**

- 15 ml üveg centrifuga kémcsőbe pipettázni  
 minta szubsztrát nélküli minta  
 – 0,2 ml  
 minta – 0,2 ml minta  
 – 0,5 ml puffert hozzáadni  
 – +40 °C-os vízfürdőn 5 percig előmelegíteni  
 +0,5 ml azokazein oldatot (40 °C) hozzáadni  
 – keverni – 30 perc inkubálás +40 °C-os vízfürdőn

**Számítás:**

$$I_{\text{E azokazein ml}}^{\wedge} = \frac{\Delta E_{0,001}}{\text{perc}} = \frac{(\Delta E - \text{vakpróba}) \times 1000}{30} \times \text{hígítás}$$

**4. példa****Hat hónapos kísérlet hízóbikákkal**

Hat hónapon át hízóbikákkal végzett kísérlet során kilenc-kilenc állatból álló csoportok állatonként és naponta 100 ppm, illetve 200 ppm (*Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sejtjeinek elválasztása után a felülúszó megszárításával nyert) enzimet kaptak kiegészítő takarmány kilogrammonként. Ez a mennyiség állatonként és naponta átlagosan 326 mg, illetve 454 mg enzimkeveréknek felel meg. A növekedés és a takarmányhasznosítás készítményfüggő javulás mellett a kezelt állatokon semmiféle feltűnő jel nem mutatkozott.

**5. példa****Patkányokkal végzett kísérlet**

65–180 g élőtömeg súlyszakaszban lévő patkányok olyan szabványosított patkánytakarmányt (Altromin Nr. 3121 Altromin International, Lage Lippe, NSZK) kaptak, amely növekvő patkányok szükségletéhez volt igazítva. Egy kezeléshez 6 állatot használtunk és az állatokat kontrollcsoportra (adalék nélkül), I. vizsgálati csoportra (19 E lizozim aktivitás/mg takarmány) és II. vizsgálati csoportra (38 E lizozim aktivitás/mg takarmány) osztottuk fel. Az állatokat anyagcsere-ketrecben tartottuk.

A takarmány-felvételt naponta, a súlyt hetente mindenkor állatonként rögzítettük. 14 napos etetési szakaszt 7 napos kvantitatív széklet és vizeletgyűjtéssel összekapcsolt nitrogénmérleg meghatározó szakasz követett.

A fehérje megkötés mértékét a takarmányból felvett nitrogén és a széklettel és a vizelettel kiválasztott nitrogén különbségéből számítottuk ki.

**Eredmények (1. táblázat)**

A súlygyarapodás az I. vizsgálati csoportnál 4,2%, a II. vizsgálati csoportnál 3,1% volt, a takarmány-felhasználás átlagosan 3,3%-kal csökkent. A nitrogénretenció átlagosan 28,5, illetve 25,2%-kal javult.

**6. példa****Malacokkal végzett kísérlet**

15–25 kg élőtömeg súlyszakaszban lévő malacok gabona-, szója- és halliszt alapú keveréktakarmányt kaptak, amelyet szükség szerint vitaminokkal nyom- és

- 0,2 ml 70%-os perklorosavat hozzáadni (reakció befagyasztás)  
 – keverni  
 – 5 percig szobahőmérsékleten állni hagyni  
 – a lecsapódott kazeint lecentrifugálni  
 – a felülúszó fotometriás meghatározása ( $E_{440}$ )

Vakpróba: a minta helyére a puffert tesszük.

A vakpróba  $E_{440}$  értékének 0,050–0,060-nak kell lennie

makroelemekkel egészítettünk ki (3. táblázat). A kontrollcsoport ( $n=10$ ) adalék nélküli takarmányt kapott, a vizsgálati csoport ( $n=7$ ) 10 E lizozim aktivitás/kg takarmány adalékkal kiegészített takarmányt kapott.

A takarmányfelvételt etetésenként (2/nap), a súlygyarapodást hetenként rögzítettük. A napi súlygyarapodást (g/nap) és a takarmány-felhasználást (kg takarmány/kg növekedés) a kísérleti végén számítottuk ki.

**Eredmények (2. táblázat)**

Az adalékanyag okozta súlygyarapodás átlagosan 4,7%-kal javult, a takarmány-felhasználás átlagosan 8,5%-kal csökkent.

**1. táblázat**

Lizozim/proteáz keverék hatása patkányokra

| Csoport        | Aktivitás      |         | Napi súlygyarapodás g/nap | Takarmány-felhasználás | Nitrogénretenci-<br>6 g/d |
|----------------|----------------|---------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
|                | lizozim        | proteáz |                           |                        |                           |
|                | E/mg takarmány |         |                           |                        |                           |
| kontroll       |                |         | 5,46                      | 3,04                   | 0,151                     |
|                |                |         | ±0,16                     | ±0,09                  | ±0,010                    |
|                |                |         | 100,0                     | 100,0                  | 100,0                     |
| I              | 19             | 0,04    | 5,69                      | 2,94                   | 0,194                     |
|                |                |         | ±0,18                     | ±0,12                  | ±0,016                    |
|                |                |         | 104,2                     | 96,7                   | 128,5,                    |
| II             | 38             | 0,08    | 5,63                      | 2,94                   | 0,189                     |
|                |                |         | ±0,13                     | ±0,09                  | ±0,008,                   |
|                |                |         | 103,1                     | 96,7                   | 125,2,                    |
| p <sup>x</sup> |                | ≤       | 0,05                      | 0,05                   | 0,001,                    |

<sup>x</sup> hibavalószínűség

**2. táblázat**

Lizozim/proteáz keverék hatása malacokra

| Aktivitás<br>lizozim proteáz<br>E/mg takarmány | Napi súlygyarapodás<br>g/nap | Takarmányfelhasználás |
|------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| kontroll                                       | 400,7                        | 1,89                  |
|                                                |                              | ±77,3                 |

| Aktivitás<br>lizozim proteáz<br>E/mg takarmány | Napi súlygyarapodás<br>g/nap | Takar-<br>mányfelhasználás |
|------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                                                |                              | 100,0                      |
| 10 6,7×10 <sup>-5</sup>                        | 419,5                        | 1,73                       |
|                                                |                              | ±61,2                      |
|                                                |                              | 104,7                      |

3. táblázat  
Takarmányösszetétel%-ban

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| árpa                        | 20,0 |
| búza                        | 10,0 |
| zab                         | 6,0  |
| kukorica                    | 25,2 |
| lenpogácsa                  | 5,5  |
| lucernaliszt                | 4,0  |
| extrahált szójadara         | 18,0 |
| halliszt                    | 4,0  |
| búzakorpa                   | 5,0  |
| vitaminok és ásványianyagok | 2,3  |

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás állatok tömeggyarapodásának fokozására és takarmányhasznosításának javítására, *azzal jellemezve*, hogy az állatokkal adalékanyagként Streptomyces coelicolor DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó N-acetilmuramidáz aktivitású baktériumlizáló enzime(ke)t 0,1–1000 E enzim/mg takarmány mennyiségben tartalmazó takarmányt etetünk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az N-acetilmuramidáz aktivitással rendelkező baktériumlizáló enzime(ke)t 0,5–5 E enzim/mg takarmány mennyiségben tartalmazó takarmányt etetünk.

3. Eljárás állatok tömeggyarapodásának fokozására és takarmányhasznosításának javítására, *azzal jellemezve*, hogy az állatokkal adalékanyagként Streptomyces coelicolor DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó N-acetilmuramidáz aktivitással rendelkező baktériumlizáló enzim(ek) és proteázok keverékét 0,1–1000 E enzim/mg takarmány mennyiségben tartalmazó takarmányt etetünk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzimeket szárított tenyészlé formában alkalmazzuk.

5. A 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az N-acetilmuramidáz aktivitással rendelkező baktériumlizáló enzime(ke)t 0,5–5 E/mg takarmány mennyiségben tartalmazó takarmányt etetünk.

6. A 3–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumlizáló enzimek és proteázok enzimaktivitásra vonatkoztatott 1:1–1000:1 arányú keverékét alkalmazzuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumlizáló enzimek és proteázok enzimaktivitásra vonatkoztatott 100:1–500:1 arányú keverékét alkalmazzuk.

8. Eljárás tömeggyarapodás fokozására és takarmányhasznosítás javítására alkalmas állati takarmányok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy Streptomyces coelicolor DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó N-acetilmuramidáz aktivitással rendelkező baktériumlizáló enzime(ke)t 0,1–1000 E enzim/mg takarmány mennyiségben a takarmányokhoz keverjük.

9. Eljárás tömeggyarapodás fokozására és takarmányhasznosítás javítására alkalmas állati takarmányok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy Streptomyces coelicolor DSM 3030-ból, valamint ennek mutánsaiból és variánsaiból származó baktériumlizáló enzim(ek) és proteázok keverékét 0,1–1000 E enzim/mg takarmány mennyiségben a takarmányokhoz keverjük.