

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190782** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.06.15

(51) Int. Cl. *A23K 20/189* (2016.01)
A23K 20/195 (2016.01)
C12N 9/36 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.17

(54) **КОРМОВАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **18194824.1; 19176972.8**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.09.17; 2019.05.28**

Амери Хавьер Алехандро, Кардосо

(33) **EP**

Биттенкорт Летисия, Идальго

(86) **PCT/EP2019/074773**

Марсело, Лопес-Улибарри Руаль,

(87) **WO 2020/058223 2020.03.26**

Махиджа Виджай, Перес Кальво

(71) Заявитель:

Эстефания, Валиентес Роландо (CH)

**ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL);
НОВОЗАЙМС А/С (DK)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данным изобретением предлагается композиция и/или корм для животных, содержащие полипептиды, обладающие мурамидазной активностью, и их применение.

202190782
A1

202190782

A1

КОРМОВАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Ссылка на перечень последовательностей

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

Область техники, к которой относится данное изобретение

Данное изобретение относится к композиции и/или корму для животных, содержащим полипептиды, обладающие мурамидазной активностью, и к их применению

Предшествующий уровень техники

Мурамидаза, называемая также лизоцимом, имеется у многих организмов, служа для защиты от бактерий. Этот фермент, являясь О-гликозил-гидролазой, 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 № 2379166 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 (а) вещество, повреждающее клеточную стенку бактерий, вызывая их лизис, или его соль, б) вещество, обладающее противомикробным эффектом, (с) комплексообразующее соединение, связывающее ионы металлов, и (d) лантибиотик; вещество, разрушающее клеточную стенку бактерий, или его соль представляет собой мурамидазу GH22 из белка куриного яйца.

Авторы данного изобретения обнаружили, что мурамидазы в сочетании с антибиотиками обеспечивают неожиданный эффект, а именно улучшают показатели роста у животных.

Раскрытие изобретения

Соответственно сказанному выше данное изобретение относится к композиции или корму для животных, содержащим один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков

Данное изобретение также относится к способу улучшения показателей роста у животных, включающему введение животному композиции или корма по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к применению композиции или корма для животных при улучшении показателей роста у животных.

Данное изобретение также относится к способу сокращения применения антибиотиков у животных, включающему введение животному одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью.

Данное изобретение также относится к применению одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, при сокращении применения антибиотиков у животных.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO 1 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Acremonium alcalophilum*, описанной в публикации WO2013/076253 (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 2 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Acremonium alcalophilum*, описанной в публикации WO2013/076253 (SEQ ID NO: 8).

SEQ ID NO: 3 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Aspergillus fumigatus*, описанной в публикации WO2011/104339 (SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 4 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Trichoderma reesei*, описанной в публикации WO2009/102755 (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 5 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Trametes cinnabarina*, описанной в публикации WO2005/080559 (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 6 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Sporormia fimetaria*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 7 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Poronia punctata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 6).

SEQ ID NO: 8 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Poronia punctata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 9).

SEQ ID NO: 9 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Lecanicillium* sp. WMM742, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 12).

SEQ ID NO: 10 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Lecanicillium* sp. WMM742, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 15).

SEQ ID NO: 11 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Onygena equina*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 18).

SEQ ID NO: 12 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Purpureocillium lilacinum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 21).

SEQ ID NO: 13 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Trichobolus zukalii*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 24).

SEQ ID NO: 14 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Penicillium citrinum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 27).

SEQ ID NO: 15 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Cladorrhinum bulbiliosum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 30).

SEQ ID NO: 16 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Umbelopsis westeae*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 33).

SEQ ID NO: 17 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Zygomycetes* sp. XZ2655, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 36).

SEQ ID NO: 18 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Chaetomium cupreum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 39).

SEQ ID NO: 19 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Cordyceps cardinalis*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978 (SEQ ID NO: 42).

SEQ ID NO: 20 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из

Penicillium sp. 'qii', описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 45).

SEQ ID NO: 21 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Aspergillus* sp. nov XZ2609, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 48).

SEQ ID NO: 22 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Paecilomyces* sp. XZ2658, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 51).

SEQ ID NO: 23 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Paecilomyces* sp. XZ2658, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 54).

SEQ ID NO: 24 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Pycnidophora* cf. *dispera*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 60).

SEQ ID NO: 25 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Thermomucor indicae-seudaticae*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 63).

SEQ ID NO: 26 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Isaria farinosa*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 66).

SEQ ID NO: 27 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Lecanicillium* sp. WMM742, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 69).

SEQ ID NO: 28 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Zopfella* sp. t180-6, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 72).

SEQ ID NO: 29 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Malbranchea flava*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 75).

SEQ ID NO: 30 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Hypholoma polytrichi*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 80).

SEQ ID NO: 31 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Aspergillus deflectus*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 83).

SEQ ID NO: 32 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Ascobolus stictoides*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 86).

SEQ ID NO: 33 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Coniochaeta* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 89).

SEQ ID NO: 34 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Daldinia fissa*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 92).

SEQ ID NO: 35 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Rosellinia* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 95).

SEQ ID NO: 36 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Ascobolus* sp. ZY179, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 98).

SEQ ID NO: 37 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Curreya* sp. XZ2623, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 101).

SEQ ID NO: 38 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Coniothyrium* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 104).

SEQ ID NO: 39 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Huroxylon* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 107).

SEQ ID NO: 40 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Xylariaceae* sp. 1653h, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 110).

SEQ ID NO: 41 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Huroxylon* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 113).

SEQ ID NO: 42 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Yunnania penicillata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 116).

SEQ ID NO: 43 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Engyodontium album*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 119).

SEQ ID NO: 44 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Metarochonia bulbilosa*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 122).

SEQ ID NO: 45 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Hamigera paravellanea*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 125).

SEQ ID NO: 46 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Metarhizium iadini*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 128).

SEQ ID NO: 47 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Thermoascus aurantiacus*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 131).

SEQ ID NO: 48 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Clonostachys rosmaniae*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 134).

SEQ ID NO: 49 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Simplicillium obclavatum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 137).

SEQ ID NO: 50 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Aspergillus inflatus*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 140).

SEQ ID NO: 51 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Paracremonium inflatum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 143).

SEQ ID NO: 52 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Westerdykella* sp., описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 146).

SEQ ID NO: 53 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Stropharia semiglobata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 155).

SEQ ID NO: 54 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Gelasinospora cratophora*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 158).

SEQ ID NO: 55 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из

Flammulina velutipes, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 221).

SEQ ID NO: 56 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Deconica coprophila*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 224).

SEQ ID NO: 57 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Rhizomucor pusillus*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 227).

SEQ ID NO: 58 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Stropharia semiglobata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 230).

SEQ ID NO: 59 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Stropharia semiglobata*, описанной в заявке PCT/CN2017/075978(SEQ ID NO: 233).

SEQ ID NO: 60 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Myceliophthora fergusii*, описанной в заявке PCT/CN2017/075960 (SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 61 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Mortierella alpina*, описанной в заявке PCT/CN2017/075960 (SEQ ID NO: 15).

SEQ ID NO: 62 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH25 из *Penicillium atrovenerum*, описанной в заявке PCT/CN2017/075960 (SEQ ID NO: 27).

SEQ ID NO: 63 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Trichophaea saccata*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 257).

SEQ ID NO: 64 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Chaetomium thermophilum*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 264).

SEQ ID NO: 65 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Trichoderma harzianum*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 267).

SEQ ID NO: 66 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Trichophaea minuta*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 291).

SEQ ID NO: 67 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Chaetomium sp. ZY287*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 294).

SEQ ID NO: 68 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Mortierella sp. ZY002*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 297).

SEQ ID NO: 69 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Metarhizium sp. XZ2431*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 300).

SEQ ID NO: 70 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Geomyces auratus*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 303).

SEQ ID NO: 71 – зрелая аминокислотная последовательность мурамидазы GH24 из *Plyonectria rufa*, описанной в публикации WO2017/000922 (SEQ ID NO: 306).

Определения

Животное. Термин «животное» относится к любому животному кроме человека.

Примеры животных включают животных с однокамерным желудком, в том числе (но не ограничиваясь перечисленным здесь) свиней (включая, но не только, поросят-сосунов, поросят-отъемышей и свиноматок); домашнюю птицу, например домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей (включая сквобов) 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 «теплокровные» породы), ракообразных (включая, но не только, пильчатых и настоящих креветок) и рыб (включая, 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, пескарей, карасей, гурами, гарруп и групперов, паракромисов, палтусов и камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов и макрель, ханосов и лактаров, герресов и 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 судака), длинноусого гетеробранха, вареху, нотрописов и масляную рыбу, головешек, змееголовов, луцианов, робал, камбал, пестряков, осетров, солнечных, линей, акар, тилапий, форелей, тунцов, палтусов, ряпушку и сигов).

Корм для животных. Термин «корм/пища для животных» в настоящем документе относится к любому веществу, продукту или смеси, пригодной или предназначенной для поедания животным. Корм для животных с однокамерным желудком содержит, как правило, концентраты, а также витамины, минеральные вещества, ферменты, пробиотики, аминокислоты и/или другие пищевые ингредиенты (как, например, в премиксах). Корм для жвачных животных содержит, как правило, фураж, включающий сочный (силос) или охраненный (грубый) растительный корм, концентраты, а также витамины, минеральные вещества, ферменты, пробиотики, аминокислоты и/или другие пищевые ингредиенты (как, например, в премиксах).

Концентрат. Термин «концентрат» означает высококалорийный пищевой (кормовой) продукт с большим содержанием белка, 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 канола), арахиса или других растений, образующих подземные маслосодержащие органы), кокосовый жмых, дрожжевой экстракт и другие дрожжевые

продукты, влажную зерновую барду (WDS) и сухую зерновую барду 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, свинорой 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 свекольная 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.

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- и/или C-конца по сравнению с аминокислотной последовательностью зрелого полипептида или домена.

В одном из вариантов воплощения данного изобретения фрагмент мурамидазы GH24 (например, одна из последовательностей SEQ ID NO: 63-71) содержит по меньшей мере 230 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 235 аминокислотных остатков, по меньшей мере 240 аминокислотных остатков или по меньшей мере 245 аминокислотных остатков и обладает мурамидазной активностью. В другом варианте воплощения данного изобретения фрагмент мурамидазы GH24 (например, одна из последовательностей SEQ ID NO: 63-71) содержит по меньшей мере 90% аминокислотной последовательности зрелого полипептида, например по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности зрелого полипептида и обладает мурамидазной активностью.

В одном из вариантов воплощения данного изобретения фрагмент мурамидазы GH25 (например, одна из последовательностей SEQ ID NO: 1-72) содержит по меньшей мере 180 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 185 аминокислотных

остатков, по меньшей мере 190 аминокислотных остатков, по меньшей мере 195 аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 аминокислотных остатков, по меньшей мере 205 аминокислотных остатков или по меньшей мере 210 аминокислотных остатков и обладает мурамидазной активностью. В другом варианте воплощения данного изобретения фрагмент мурамидазы GH25 (например, одна из последовательностей SEQ ID NO: 1-72) содержит по меньшей мере 90% аминокислотной последовательности зрелого полипептида, например по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности зрелого полипептида и обладает мурамидазной активностью.

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. INS 1105 в Объединенном справочнике пищевых добавок организации ООН по продовольствию и сельскому хозяйству (www.fao.org)). В данном изобретении мурамидазная активность определяется турбидиметрическим методом, описанным в Примере 1 настоящего документа («Определение мурамидазной активности»). Полипептид обладает мурамидазной активностью, если он проявляет литическую активность против одного или более бактериальных штаммов, например против *Micrococcus luteus* ATCC 4698 и/или *Exiguobacterium undea* (DSM14481). Например, мурамидаза GH25 по данному изобретению 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 полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В другом примере мурамидаза GH24 по данному изобретению 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 полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63.

Зрелый полипептид. Термин «зрелый полипептид» означает полипептид в его окончательной форме, которую он принимает после трансляции и посттрансляционных модификаций, например изменения или укорочения N- или C-концевого участка, гликозилирования, фосфорилирования и проч.

По данному изобретению зрелый полипептид может представлять собой участок с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, с 1-го по 213-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, с 1-го по 218-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, с 1-го по 215-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, с 1-го по 201-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, с 1-го по 201-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, с 1-го по 203-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, с 1-го по 206-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, с 1-го по 216-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, с 1-го по 218-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, с 1-го по 204-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, с 1-го по 203-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, с 1-го по 210-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, с 1-го по 207-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, с 1-го по 208-е положения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, с 1-го по 217-е положения

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64, с 1-го по 248-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, с 1-го по 245-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, с 1-го по 249-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67, с 1-го по 245-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68, с 1-го по 247-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69, с 1-го по 250-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70, с 1-го по 240-е положения
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71.

Полученный/выделенный из (или может быть получен/выделен из). Выражение «полученный/выделенный из (или может быть получен/выделен из)» означает, что данный полипептид может быть обнаружен в живом организме, относящимся к определенному таксону. Полипептиды по данному изобретению получают/выделяют (или они могут быть получены/выделены) предпочтительно из представителей царства грибов (здесь слово «царство» означает таксон высшего ранга). Более предпочтительно полипептиды по данному изобретению получают/выделяют (или они могут быть получены/выделены) из представителей типа *Ascomycota*, например, подтипа *Pezizomycotina* (здесь «тип» и «подтип» - таксономические ранги). Более предпочтительно полипептиды по данному изобретению получают/выделяют (или они могут быть получены/выделены) из представителей класса *Eurotiomycetes* (здесь «класс» - таксономический ранг).

Если таксон 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 (NCIB) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сравнивая данный полипептид с ближайшими гомологами. Опытный специалист может также сравнить их с последовательностями, приведенными в настоящем документе. Неизвестный полипептид, являющийся фрагментом известного полипептида, считается относящимся к тому же виду живых организмов. Неизвестный природный полипептид или искусственный вариант, содержащий замены, делеции и/или вставки не более чем в 10 положениях аминокислотной последовательности по сравнению с известным полипептидом, считается относящимся к тому же виду живых организмов, что и этот известный полипептид.

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 (например, солома, копра, початки кукурузы без зерен, полова, отходы производства свекловичного сахара).

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 S.B., Wunsch C.D., 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice P. 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

$$\frac{(\text{Количество совпадающих аминокислотных остатков}) \times 100}{(\text{Длина выравнивания} - \text{суммарное количество пропусков в выравнивании})}$$

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.

По данному изобретению вариант мурамидазы может содержать от 1 до 10 изменений, то есть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изменений и обладать 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%, от по меньшей мере 100% от мурамидазной активности исходной мурамидазы, например полипептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 63.

Антибиотик. Термин «антибиотик» в настоящем документе означает синтетическое или природное органическое химическое соединение, предотвращающее или подавляющее жизнедеятельность и/или размножение микроорганизмов, которое применяется при лечении инфекционных заболеваний животных, чаще всего в низких концентрациях.

Осуществление изобретения

Композиция

Было обнаружено, что композиция, содержащая мурамидазу (предпочтительно грибного происхождения) и антибиотик, положительно влияет на продуктивность и инерция состояние животных.

Таким образом, в первом своем аспекте данное изобретение относится к композиции, содержащей один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков.

По данному изобретению полипептид, обладающий мурамидазной активностью, является мурамидазой GH24, предпочтительно грибной мурамидазой GH24, предпочтительно полученной (или ее можно получить) из представителя типа *Ascomycota*, более предпочтительно - из представителя класса *Eurotiomycetes*. Полипептид, обладающий мурамидазной активностью, может быть также мурамидазой GH25, предпочтительно грибной мурамидазой GH25, предпочтительно полученной (или ее можно получить) из представителя типа *Ascomycota*, более предпочтительно - из представителя класса *Eurotiomycetes*.

Антибиотиком по данному изобретению может быть любое из следующих веществ: бацитрацин, бамбермицин, карбадокс, энрамицин, эндурацидин, лаидломицин, лазалоцид, линкомицин, монензин, неомицин, пенициллин, роксарсон, салиномицин, тилозин и виргиниамицин.

Предпочтительно данное изобретение относится к композиции, содержащей один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков, причем полипептид, обладающий мурамидазной активностью, выбирают из группы, состоящей из

(a) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 1;

(b) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 2;

(c) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 3;

(d) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного

(bk) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 63;

(bl) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 64;

(bm) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 65;

(bn) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 66;

(bo) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 67;

(bp) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 68;

(bq) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 69;

(br) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 70;

(bs) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100%, идентичного последовательности SEQ ID NO: 71;

(bt) варианта последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ

ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, содержащего одну или более замен (предпочтительно консервативных замен), и/или одну или более делеций, и/или одну или более вставок аминокислотных остатков, или любые комбинации указанных изменений в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положениях полипептидной цепи;

(bu) полипептида, содержащего полипептид по пункту (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (w), (x), (y), (z), (aa), (ab), (ac), (ad), (ae), (af), (ag), (ah), (ai), (aj), (ak), (al), (am), (an), (ao), (ap), (aq), (ar), (as), (at), (au), (av), (aw), (ax), (ay), (az), (ba), (bb), (bc), (bd), (be), (bf), (bg), (bh), (bi), (bj), (bk), (bl), (bm), (bn), (bo), (bp), (bq), (br), (bs) или (bt) и наращение на N- и/или C-конце полипептидной цепи длиной 1-10 аминокислотных остатков; и

(bv) фрагмента полипептида по пункту (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (w), (x), (y), (z), (aa), (ab), (ac), (ad), (ae), (af), (ag), (ah), (ai), (aj), (ak), (al), (am), (an), (ao), (ap), (aq), (ar), (as), (at), (au), (av), (aw), (ax), (ay), (az), (ba), (bb), (bc), (bd), (be), (bf), (bg), (bh), (bi), (bj), (bk), (bl), (bm), (bn), (bo), (bp), (bq), (br), (bs) или (bt), обладающего мурамидазной активностью и составляющего по меньшей мере 90% полной аминокислотной последовательности зрелого полипептида..

Более предпочтительно, чтобы полипептид, обладающий мурамидазной активностью, по данному изобретению содержал аминокислотные остатки (или состоял из них) с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 1, с 1-го по 213-й последовательности SEQ ID NO: 2, с 1-го по 218-й последовательности SEQ ID NO: 3, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 4, с 1-го по 215-й последовательности SEQ ID NO: 5, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 6, с 1-го по 201-й последовательности SEQ ID NO: 7, с 1-го по 201-й последовательности SEQ ID NO: 8, с 1-го по 203-й последовательности SEQ ID NO: 9, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 10, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 11, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 12, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 13, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 14, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 15, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 16, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 17, с 1-го по 206-й последовательности SEQ ID NO: 18, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 19, с 1-го по 216-й последовательности

SEQ ID NO: 20, с 1-го по 218-й последовательности SEQ ID NO: 21, с 1-го по 204-й последовательности SEQ ID NO: 22, с 1-го по 203-й последовательности SEQ ID NO: 23, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 24, с 1-го по 210-й последовательности SEQ ID NO: 25, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 26, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 27, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 28, с 1-го по 217-й последовательности SEQ ID NO: 29, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 30, с 1-го по 201-й последовательности SEQ ID NO: 31, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 32, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 33, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 34, с 1-го по 201-й последовательности SEQ ID NO: 35, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 36, с 1-го по 206-й последовательности SEQ ID NO: 37, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 38, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 39, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 40, с 1-го по 202-й последовательности SEQ ID NO: 41, с 1-го по 206-й последовательности SEQ ID NO: 42, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 43, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 44, с 1-го по 215-й последовательности SEQ ID NO: 45, с 1-го по 217-й последовательности SEQ ID NO: 46, с 1-го по 214-й последовательности SEQ ID NO: 47, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 48, с 1-го по 203-й последовательности SEQ ID NO: 49, с 1-го по 216-й последовательности SEQ ID NO: 50, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 51, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 52, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 53, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 54, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 55, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 56, с 1-го по 208-й последовательности SEQ ID NO: 57, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 58, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 59, с 1-го по 207-й последовательности SEQ ID NO: 60, с 1-го по 204-й последовательности SEQ ID NO: 61, с 1-го по 216-й последовательности SEQ ID NO: 62, с 1-го по 245-й последовательности SEQ ID NO: 63, с 1-го по 249-й последовательности SEQ ID NO: 64, с 1-го по 248-й последовательности SEQ ID NO: 65, с 1-го по 245-й последовательности SEQ ID NO: 66, с 1-го по 249-й последовательности SEQ ID NO: 67, с 1-го по 245-й последовательности SEQ ID NO: 68, с 1-го по 247-й последовательности SEQ ID NO: 69, с 1-го по 250-й последовательности SEQ ID NO: 70 или с 1-го по 240-й последовательности SEQ ID NO: 71.

Более предпочтительно композиция по данному изобретению содержит мурамидазу, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 1, и энрамицин или бацитрацин.

Полипептид, обладающий мурамидазной активностью, по данному изобретению

дают животным из расчета 10-1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например 50-900 мг/кг, 100-800 мг/кг, 200-700 мг/кг, 300-600 мг/кг или 400-500 мг/кг, или в любой комбинации в указанных диапазонах.

По данному изобретению антибиотик дают животным из расчета 0,1-100 мг/кг мг на 1 кг корма, например 0,5-90 мг/кг, 1-80 мг/кг, 5-70 мг/кг, 10-60 мг/кг, 15-50 мг/кг или 20-40 мг/кг, или в любой комбинации в указанных диапазонах.

По данному изобретению полипептид, обладающий мурамидазной активностью, и/или антибиотик может входить в состав жидкого или твердого препарата.

Жидкий препарат по данному изобретению может содержать также многоатомный спирт, который выбирают из группы, состоящей из глицерина, сорбита, пропиленгликоля (MPG), этиленгликоля, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, 1,2-пропиленгликоля или 1,3-пропиленгликоля, дипропиленгликоля, полиэтиленгликоля (PEG) со средней молекулярной массой менее около 600 и полипропиленгликоля (PPG) со средней молекулярной массой менее около 600.

Жидкий препарат по данному изобретению может содержать также консервант, предпочтительно выбираемый из группы, состоящей из сорбата натрия, сорбата калия, бензоата натрия и бензоата калия или любых их комбинаций.

Жидкий препарат по данному изобретению содержит один или более препаратобразующих агентов (например, описанных в настоящем документе), предпочтительно выбираемых из группы, состоящей из 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, поливинилацетата (PVA), ацетата и фосфата; предпочтительно выбираемых из группы, состоящей из 1,2-пропиленгликоля, 1,3-пропиленгликоля, сульфата натрия, декстрина, целлюлозы, тиосульфата натрия, каолина и карбоната кальция.

Твердый препарат по данному изобретению может быть представлен гранулами, порошком (полученным распылительной сушкой) или крупкой. (например, как описано в публикации WO2000/70034). Препаратообразующий агент в твердом препарате по данному изобретению может быть представлен солью (органическими или неорганическими 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, 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).

Предпочтительно препаратобразующий агент твердого препарата по данному изобретению выбирают из группы, состоящей 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. Предпочтительно препаратобразующий агент выбирают из одного или более из следующих веществ: сульфата натрия, декстрина, целлюлозы, тиосульфата натрия, сульфата магния и карбоната кальция.

Композиция по данному изобретению может содержать также один или более носителей. Носитель по данному изобретению выбирают из группы, состоящей из воды, 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, мальтодекстрина, глюкозы, сахарозы, сорбита, лактозы, пшеничной муки, пшеничных отрубей, кукурузно-глютеновой муки, крахмала, каолина и целлюлозы или любых их комбинаций.

Корм для животных

Во втором своем аспекте данное изобретение относится к корму для животных, содержащему кормовую добавку, один или более источников белка и один или более источников энергии и отличающийся тем, что содержит также один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков, как описано выше.

Кормовая композиция или корма по данному изобретению характеризуются относительно высоким содержанием сырого белка. Описание кормов для домашней птицы и свиней представлено в таблице В публикации WO 2001/058275 (колонки 2-3); описание кормов для рыб представлено 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. Источником белка может быть растительный белок и/или животный белок.

По данному изобретению растительный белок берется из таких источников, как бобовые и зерновые, например из материала растений семейств Fabaceae (бобовых), Cruciferaeae (крестоцветных), Chenopodiaceae (маревых) и Poaceae (злаков); таким

материалом могут быть, например, соевые мука или шрот, мука из люпина, рапсовые жмых, шрот или мука или их комбинации. Содержание белка из растительных источников составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 масс. %.

Предпочтительно 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. По данному изобретению предпочтительным источником растительного белка являются плоды сои. Другие примеры источников растительного белка – злаки, например, ячмень, пшеница, рожь, овес, кукуруза, рис и сорго.

Помимо указанного выше растительного белка корм по данному изобретению также может содержать животный белок, например мясо-костную муку, перьевую муку и/или рыбную муку, как правило, в количестве 0-25%. Корм по данному изобретению также может содержать сухую зерновую барду с гидролизатами (DDGS), как правило, в количестве 0-30%.

Источник белка по данному изобретению предпочтительно выбирают из группы, состоящей из плодов сои, плодов дикой сои, фасоли, люпина, фасоли остролистной, турецких бобов, *Phaseolus filiformis*, лимской фасоли, фасоли многоцветковой, садового (конского) боба, нута, чечевицы, арахиса, испанского арахиса, чечевицы, канадских сортов рапса (канолы), семян подсолнечника, семян хлопка, семян рапса (масличных сортов) или гороха или продуктов переработки указанных источников, например соевого шрота, соевой муки, полножирного соевого шрота, соевого белкового концентрата (SPC), ферментированного соевого шрота (FSBM), подсолнечного шрота, шрота семян хлопка, рапсового шрота, рыбной муки, костной муки, перьевой муки, сыворотки или любых их комбинаций.

Также или в качестве альтернативы указанному выше содержанию сырого белка кормовая композиция по данному изобретению характеризуется обменной энергией 10-30 МДж/кг. Источник энергии по данному изобретению выбирают из группы, состоящей из кукурузы, сорго, ячменя, пшеницы, овса, риса, тритикале, ржи, свеклы, сахарной свеклы, шпината, картофеля, маниока, кинвы (киноа), капусты, проса прутьевидного, проса, африканского проса, итальянского проса или продуктов их переработки, например дробленой кукурузы, картофельного крахмала, маниокового крахмала, дробленого сорго, дробленого проса прутьевидного, дробленого проса, дробленого проса итальянского, дробленого проса африканского или любых их комбинаций.

Также или в качестве альтернативы указанному выше содержанию сырого белка кормовая композиция по данному изобретению характеризуется 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, 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 таблице В публикации WO 2001/058275 (R. 2-5).

Содержание сырого белка рассчитывают исходя из содержания азота (N) по формуле:

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

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).

Обменную энергию корма рассчитывают согласно Рекомендациям по питанию домашних свиней (стр. 2-6 9-го переработанного издания, 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, по изданию Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

Предпочтительно корм для животных 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.

Конечная концентрация мурамидазы в корме по данному изобретению составляет от 10 мг до 1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например 50-900 мг, 100-800 мг, 200-700 мг, 300-600 мг или 400-500 мг, или в любой комбинации в указанных диапазонах.

Конечная концентрация антибиотика в корме по данному изобретению составляет от 0,1-100 мг на 1 кг корма, например 0,5-90 мг, 1-80 мг, 5-70 мг, 10-60 мг, 15-50 мг или 20-40 мг, или в любой комбинации в указанных диапазонах.

Корм для животных по данному изобретению также содержит один или более дополнительных ферментов, один или более эубиотиков, один или более витаминов, одно или более минеральных веществ, одну или более аминокислот и один или более других пищевых ингредиентов, как описано ниже.

Дополнительные ферменты

Композиция и/или корм для животных, описанные в настоящем документе, при необходимости включают один или более ферментов. Классификация ферментов базируется на номенклатуре ферментов, рекомендованной Комиссией по номенклатуре ферментов Международного союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB; 1992); см. также интернет-сайт <http://www.expasy.ch/enzyme/>,

Существуют также классификации определенных ферментов, в частности гликозидгидролаз, например эндоглюканаз, галактаназ, маннаназ, декстраназ и галактозидаз; 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.

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать по меньшей мере один дополнительный фермент, который выбирают из группы, включающей ацетилксиланэстеразу (ЕС 3.1.1.72); ацилглицероллипазу (ЕС 3.1.1.72), α -амилазу (ЕС 3.2.1.1); β -амилазу (ЕС 3.2.1.2), арабинофуранозидазу (ЕС 3.2.1.55); целлобиогидролазу (ЕС 3.2.1.91); целлюлазу (ЕС 3.2.1.4); ферулоилэстеразу (ЕС 3.1.1.73); галактаназу (ЕС 3.2.1.89); α -галактозидазу (ЕС 3.2.1.22); β -галактозидазу (ЕС 3.2.1.23); β -глюканазу (ЕС 3.2.1.6), β -глюкозидазу (ЕС 3.2.1.21); триацилглицероллипазу (ЕС 3.1.1.3), лизофосфолипазу (ЕС 3.1.1.5); мурамидазу (ЕС 3.2.1.17), α -маннозидазу (ЕС 3.2.1.24), β -маннозидазу (маннаназу) (ЕС 3.2.1.25), фитазу (ЕС 3.1.3.8, ЕС 3.1.3.26, ЕС 3.1.3.72), фосфолипазу А1 (ЕС 3.1.1.32), фосфолипазу А2 (ЕС 3.1.1.4), фосфолипазу D (ЕС 3.1.4.4), протеазу (ЕС 3.4), пуллуланазу (ЕС 3.2.1.41), пектинэстеразу (ЕС 3.1.1.11), ксиланазу (ЕС 3.2.1.8, ЕС 3.2.1.136), β -ксилозидазу (ЕС 3.2.1.37) или любых их комбинаций.

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать галактаназу (ЕС 3.2.1.89) и β -галактозидазу (ЕС 3.2.1.23).

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать фитазу (ЕС 3.1.3.8 или 3.1.3.26). Примеры имеющихся в продаже препаратов

фитаз включают Bio-Feed™ Phytase (Novozymes), Ronozyme® P, Ronozyme® NP и Ronozyme® HiPhos (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Natuphos™ E (BASF), Finase® и Quantum® Blue (AB Enzymes), OptiPhos® (Huvepharma), AveMix® Phytase (Aveve Biochem), 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.

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать ксиланазу (ЕС 3.2.1.8). Примеры имеющихся в продаже препаратов ксиланаз включают Ronozyme® WX (DSM Nutritional Products), Econase® XT и Barley (AB Vista), Xylathin® (Verenium), Hostazym® X (Huvepharma) и Axtra® XB (ксиланазы/β-глюканаза, DuPont) и Axtra® XAP (ксиланазы/амилаза/протеаза, DuPont), AveMix® XG 10 (ксиланазы/глюканаза) и AveMix® 02 CS (ксиланазы/глюканаза/пектиназа, Aveve Biochem) и Naturgrain (BASF).

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать протеазу (ЕС 3.4). Примеры имеющихся в продаже препаратов протеаз включают Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products), Winzyme Pro Plus® (Suntaq International Limited) и Cibenza® DP100 (Novus International).

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать α-амилазу (ЕС 3.2.1.1). Примеры имеющихся в продаже препаратов α-амилаз включают Ronozyme® A and RONOZYME® RumiStar™ (DSM Nutritional Products).

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать полиферментный препарат, например FRA® Octazyme (Framelco), Ronozyme® G2, Ronozyme® VP и Ronozyme® MultiGrain (DSM Nutritional Products), Rovabio® Excel или Rovabio® Advance (Adisseo).

Эубиотики

Композиция, корм или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать эубиотики. Эубиотики – это вещества, предназначенные для того, чтобы обеспечивать нормальный баланс микрофлоры желудочно-кишечного тракта. К эубиотикам относятся различные пищевые добавки, например пробиотики, пребиотики, некоторые вещества растительного происхождения (эфирные масла) и органические кислоты, которые описаны подробнее ниже.

Пробиотики

Композиция, или корм, или кормовая добавка по данному изобретению может также содержать один или более дополнительных пробиотиков. В частности, кормовая композиция 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 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 farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria* sp.

Более предпочтительно композиция или корм 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, DSM 32315, NRRL B-50136, NRRL B-50605, NRRL B-50606, NRRL B-50622 и PTA-7547.

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

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

Более предпочтительно композиция или корм по данному изобретению также 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 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} . Предпочтительно количество бактерий каждого из бактериальных штаммов в композиции, корме или кормовой добавке по данному изобретению составляет от 1×10^8 до 1×10^{10} КОЕ/кг сухой массы.

Дозировка бактерий каждого из штаммов, присутствующих в 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. Предпочтительно дозировка бактерий каждого из штаммов, присутствующих в композиции, корме или кормовой добавке по данному изобретению, составляет от 1×10^9 до 1×10^{11} КОЕ/особь/сут. Более предпочтительно количество пробиотиков составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции, корма или кормовой добавки.

По данному изобретению один или более штаммов бактерий могут присутствовать в форме стабильных спор.

Примерами имеющихся в продаже продуктов этого типа являются Cylactin® (DSM Nutritional Products), Alterion (Adisseo), Enviva PRO (DuPont Animal Nutrition), Syncra® (смесь ферментов + пробиотик; DuPont Animal Nutrition), Ecobiol® и Fecinor® (Norel/Evonik) и GutCare® PY1 (Evonik).

Пребиотики

Пребиотики – это вещества, вызывающие размножение или активность микроорганизмов (например, бактерий или грибков), способствующих благополучной жизнедеятельности организма-хозяина. Пребиотики представляют собой, как правило, не перевариваемые организмом-хозяином соединения типа волокон, которые проходят нерасщепленными через верхние отделы пищеварительного тракта и стимулируют размножение или активность полезных бактерий, населяющих толстый кишечник, служа им субстратом. В норме пребиотики вызывают возрастание численности или активности бифидо- и лактобактерий в желудочно-кишечном тракте.

Дрожжевые препараты (инактивированные цельные клетки дрожжей или их клеточные стенки) тоже можно расценивать как пребиотики. Такие препараты, обычно получаемые из материала клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, часто содержат маннанные олигосахариды, β -глюканы или белки

Количество пребиотиков в композиции по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% относительно общей массы композиции. Примерами пригодных дрожжевых препаратов являются Yang® и Agrimos (Lallemand Animal Nutrition).

Вещества растительного происхождения

В эту группу эубиотиков относят природные стимуляторы клеточного роста или не являющиеся антибиотиками стимуляторы клеточного роста, используемые в качестве пищевых/кормовых добавок, источником которых служат некоторые травянистые, пряно-ароматические и другие растения. Пробиотик растительного происхождения может представлять собой эфирное масло/экстракт, или индивидуальное вещество, полученное

из эфирного масла/экстракта, или определенное растение, или смесь растений (травяной сбор), или смесь эфирных масел/экстрактов/растений (специализированные продукты).

Примерами растений-пробиотиков являются розмарин, шалфей, орегано (душица), тимьян (чабрец), гвоздика и цимбопогон (цитронелла, лимонное сорго). Примерами эфирных масел и экстрактивных веществ являются тимол, эвгенол, мета-крезол, эфирное масло ванили/ванилин, салицилаты, резорцин, гваякол, гингерол, лавандовое масло, иононы, ирон, эвкалиптол, ментол, мятное масло, α -пинен, лимонен, анетол, линалоол, метилдигидроясмонат, карвакрол, пропионовая кислота/пропионаты, уксусная кислота/ацетаты, масляная кислота/бутираты, розмариновое масло, гвоздичное масло, гераниол, терпинеол, цитронеллол, амил- и/или бензилсалицилат, коричный альдегид, полифенолы (таннин), экстракт куркумы.

Количество пробиотиков растительного происхождения в композиции по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции, Примерами таких продуктов, имеющих в продаже, являются Crina® (DSM Nutritional Products); Cineryg™, Biacid™, ProHacid™ Classic и ProHacid™ Advance™ (все – производства Promivi/Cargill) и Envivo EO (DuPont Animal Nutrition).

Органические кислоты

Органические кислоты, содержащие 1-7 атомов углерода (C1–C7), широко распространены в природе, будучи нормальными компонентами растительных и животных тканей. Такие соединения, кроме того, образуются в результате сбраживания углеводов микроорганизмами, что происходит главным образом в толстом кишечнике. Поскольку органические кислоты (C1–C7) обладают защитным эффектом в случае таких поражений кишечника, как некротический энтерит у кур и инфекции *Escherichia coli* у молодняка свиней, эти вещества часто используются в свиноводстве и птицеводстве в качестве заменителей антибиотиков - стимуляторов роста. В продаже они имеются в виде индивидуальных веществ или смесей, состоящих обычно из двух-трех различных органических кислот. Примерами органических кислот являются жирные кислоты с короткой углеродной цепью (например, муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная кислоты), жирные кислоты со средней длиной углеродной цепи (например, капроновая, каприловая, каприновая и лауриновая кислоты), ди- и трикарбоновые кислоты (например, фумаровая кислота), оксикарбоновые кислоты (гидроксикислоты) (например, молочная кислота), ароматические кислоты (например, бензойная кислота), лимонная кислота, сорбиновая кислота, яблочная кислота, виннокаменная кислота или их соли (типичные примеры – соли натрия или калия, например диформиат калия или маслянокислый натрий).

Количество органических кислот в композиции по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции. Примерами таких продуктов, имеющих в продаже, являются VevoVital® (DSM Nutritional Products), Amasil®, Luprisil®, Lupro-Grain®, Lupro-Cid®, Lupro-Mix® (BASF), н-масляная кислота (n-Butyric Acid AF; OXEА) и Adimix Precision (Nutriad).

Аминокислоты

Композиция или корм для животных по данному изобретению может также содержать одну или более аминокислот. Примерами пригодных аминокислот являются лизин, аланин, β-аланин, треонин, метионин и триптофан. Количество аминокислот в композиции или корме по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции или корма.

Витамины и минеральные вещества

Композиция или корм 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 композиция или корм 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 С, 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, хром, медь, фторид, йод, железо, марганец, молибден, селен и цинк.

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

Количество витаминов в композиции или корме по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции или корма. Количество минеральных веществ в композиции или корме по данному изобретению составляет от 0,001% до 10% от общей массы композиции или корма.

Потребности организма животного в этих компонентах (на примере домашней птицы и свиней/поросят) приведены в таблице А публикации WO 01/058275.

«Потребность» в данном контексте означает, что эти компоненты должны содержаться в рационе животного в указанных количествах.

Или же композиция или корм для животных по данному изобретению содержит по меньшей мере один из отдельных компонентов, приведенных в таблице 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 добавки для животных по данному изобретению в таком количестве, что концентрация этого компонента в корме находится в пределах, указанных в четвертом, или пятом, или шестом столбце таблицы А.

Предпочтительно композиция или корм для животных по данному изобретению содержит по меньшей мере один из указанных ниже витаминов предпочтительно в таком количестве, что его концентрация в корме находится в пределах, указанных в таблице 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 или корм по данному изобретению может также содержать красители, стабилизирующие агенты, добавки, стимулирующие рост, вкусоароматические вещества, полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA); соединения, генерирующие активные формы кислорода; антиоксиданты, пептиды с противомикробным действием, полипептиды с противогрибковым действием и соединения, нейтрализующие микотоксины.

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

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 противомикробных пептидов (AMP) являются CAP18, лейкоцин А, триптицин, протегрин-1, танатин, дефензины, 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 или 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).

Примерами полиненасыщенных жирных кислот по данному изобретению являются полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие 18, 20 и 22 атома углерода, например, арахидоновая, докозагексаеновая, 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.

Антиоксиданты используются для ограничения возможного образования реакционноспособных форм кислорода, чтобы их количество уравнивалось антиоксидантами.

В корме животных могут оказаться микотоксины, например, дезоксиниваленон, афлатоксин, зеараленон и фумонизин, что может привести к ухудшению показателей продуктивности и состояния животных или к заболеванию. Чтобы нивелировать такое отрицательное воздействие, в корм добавляют вещества, сдерживающие уровень микотоксинов, например путем их инактивации или связывания. Примерами продуктов, нейтрализующих микотоксины, являются Vitafix®, Vitafix Ultra (Nuscience), Mycofix®, Mycofix® Secure, FUMzyme®, Biomin® BBSH, Biomin® MTV (Biomin), Mold-Nil®, Toxy-Nil® и Unike® Plus (Nutriad).

Способы улучшения показателей продуктивности и состояния животных и/или сокращения использования антибиотиков

В третьем своем аспекте данное изобретение относится к способу улучшения показателей роста животных, включающему введение животному композиции или корма, содержащих один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и

один или более антибиотиков, как описано выше.

В четвертом своем аспекте данное изобретение относится к способу сокращения использования антибиотиков у животных, включающему введение животному одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью

В частности, данное изобретение относится к способу улучшения таких показателей, как масса тела (BW) животного, прирост массы тела (BWG), коэффициент кормоотдачи, или конверсия корма (FCR) и Европейский индекс эффективности производства (EPEF), включающему введение животному композиции или корма, содержащих один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков, как описано выше.

По данному изобретению «улучшение показателя» означает увеличение массы тела (BW) животного, прироста массы тела (BWG) или Европейского индекса эффективности производства (EPEF) или уменьшение коэффициента кормоотдачи (FCR) при сравнении с тем же кормом, но не содержащим полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, или антибиотиков, или и того, и другого.

По данному изобретению увеличение массы тела (BW) животных, прироста массы тела (BWG) или Европейского индекса эффективности производства (EPEF) может составлять по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 3,5%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5%,

По данному изобретению снижение коэффициента кормоотдачи (FCR) может составлять по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 3,5%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5%.

По данному изобретению уменьшение количества антибиотиков у животных может составлять по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% в сравнении с отрицательным контролем, то есть отсутствием полипептидов, обладающих мурамидазной активностью.

По данному изобретению полипептиды, обладающие мурамидазной активностью, дают животным из расчета от 10 мг до 1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например от 50 мг/кг до 900 мг/кг, от 100 мг/кг до 800 мг/кг, от 200 мг/кг до 700 мг/кг, от 300 мг/кг до 600 мг/кг от или от 400 мг/кг до 500 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

По данному изобретению антибиотик дают животным из расчета от 0,1 мг до 100

мг/ на 1 кг корма, например от 0,5 мг/кг до 90 мг/кг, от 1 мг/кг до 80 мг/кг, от 5 мг/кг до 70 мг/кг, от 10 мг/кг до 60 мг/кг, от 15 мг/кг до 50 мг/кг или от 20 мг/кг до 40 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

По данному изобретению животное является животным с однокамерным желудком, включая свиней (в том числе, но не только, поросят-сосунов, поросят-отъемышей и свиноматок); домашнюю птицу (в том числе, но не только, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок, цыплят), домашних питомцев, например кошек и собак, 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, пескарей, карасей, гурами, гарруп и груперов, паракромисов, палтусов и камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов и макрель, ханосов и лактаров, герресов и махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пираньевых, 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 и сигов) и ракообразных (в том числе, но не только, пильчатых и настоящих креветок). В более предпочтительном воплощении данного изобретения животное выбирают из группы, состоящей из свиней, домашней птицы, ракообразных и рыб. В еще более предпочтительном воплощении данного изобретения животное выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят

Применение при улучшении показателей продуктивности и состояния животных и/или сокращении использования антибиотиков

В пятом своем аспекте данное изобретение относится к применению композиции или корма для животных при улучшении показателей роста и/или при сокращении количества антибиотиков у животных, причем эти композиция и корм содержат один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков, как описано выше.

В шестом своем аспекте данное изобретение относится к применению одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, при сокращении количества антибиотиков у животных.

В частности, данное изобретение относится к применению композиции или корма для животных при улучшении таких показателей, как масса тела (BW) животного, прирост массы тела (DWG), коэффициент кормоотдачи (FCR) и Европейский индекс эффективности производства (EPEF), причем эти композиция или корм содержат один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков, как описано выше.

По данному изобретению «улучшение показателя» означает увеличение массы тела (BW) животного, прироста массы тела (BWG) или Европейского индекса эффективности производства (EPEF) или уменьшение коэффициента кормоотдачи (FCR) при сравнении с тем же кормом, но не содержащим полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, или антибиотиков, или и того, и другого.

По данному изобретению увеличение массы тела (BW) животного, прироста массы тела (BWG) или Европейского индекса эффективности производства (EPEF) может составлять по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 3,5%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5%,

По данному изобретению снижение коэффициента кормоотдачи (FCR) может составлять по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 3,5%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5%.

По данному изобретению уменьшение количества антибиотиков у животных может составлять по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% в сравнении с отрицательным контролем, то есть отсутствием полипептидов, обладающих мурамидазной активностью.

По данному изобретению полипептиды, обладающие мурамидазной активностью, дают животным из расчета от 10 мг до 1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например от 50 мг/кг до 900 мг/кг, от 100 мг/кг до 800 мг/кг, от 200 мг/кг до 700 мг/кг, от 300 мг/кг до 600 мг/к от или от 400 мг/кг до 500 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

По данному изобретению антибиотик дают животным из расчета от 0,1 мг до 100 мг/ на 1 кг корма, например, от 0,5 мг/кг до 90 мг/кг, от 1 мг/кг до 80 мг/кг, от 5 мг/кг до 70 мг/кг, от 10 мг/кг до 60 мг/кг, от 15 мг/кг до 50 мг/кг или от 20 мг/кг до 40 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

По данному изобретению животное является животным с однокамерным

желудком, включая свиней (в том числе, но не только, поросят-сосунов, поросят-отъемышей и свиноматок); домашнюю птицу (в том числе, но не только, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок, цыплят), 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, пескарей, карасей, гурами, гарруп и групперов, парахромисов, палтусов и камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов и макрель, ханосов и лактаров, герресов и махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пираньевых, 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 и сигов) и ракообразных (в том числе, но не только, пильчатых и настоящих креветок). В более предпочтительном воплощении данного изобретения животное выбирают из группы, состоящей из свиней, домашней птицы, ракообразных и рыб. В еще более предпочтительном воплощении данного изобретения животное выбирают из группы, состоящей из свиней, поросят-сосунов, поросят-отъемышей, свиноматок, кур, бройлеров, куриц-несушек, куриц-молодок и цыплят.

Данное изобретение далее иллюстрируется приведенными ниже примерами.

Примеры

Пример 1. Определение мурамидазной активности.

Мурамидазную активность определяли, измеряя уменьшение поглощения/оптической плотности раствора с суспендированными бактериями *Micrococcus lysodeikticus* ATTC No. 4698 (Sigma-Aldrich M3770) на длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера (Tecan Infinite M200).

Получение субстрата - *Micrococcus lysodeikticus*

Перед использованием бактериальные клетки суспендировали в деионизованной воде до концентрации 10 мг клеток/мл и измеряли поглощение/оптическую плотность (OD) на длине волны 450 нм. Доводили концентрацию клеток в суспензии до оптической плотности $OD_{450}=1,0$ (для турбидиметрического анализа готовили смесь 180 мкл буферного раствора + 20 мкл образца + 20 мкл субстрата). Полученную суспензию клеток до использования держали при температуре окружающей среды. Суспендированные клетки использовали не позже чем через 3 часа.

Приготовление буферного раствора (фосфат/цитрат, рН 4)

Смешивали 61,45 мл раствора лимонной кислоты (0,1 М) с 38,55 мл раствора двузамещенного фосфата натрия (0,2 М) и доводили рН до 4 растворами соляной кислоты гидроксида натрия

Турбидиметрическое определение противомикробной активности мурамидазы.

Содержащий мурамидазу образец, подлежащий анализу, разбавляли деионизованной водой до концентрации 50 мг белка-фермента/л и держали на льду вплоть до использования. В лунки 96-луночного микропланшета (Nunc) вносили по 180 мкл буферного раствора (цитрат/фосфат, рН 4) и добавляли по 20 мкл разведенного образца с мурамидазой; планшет держали на холоде (при температуре 5°C). Добавляли в лунки по 20 мкл субстрата (*Micrococcus lysodeikticus*) и при помощи микропланшетного ридера в каждой лунке измеряли изменение поглощения на длине волны 450 нм при температуре 37°C в течение 1 часа. Если в образце имелась мурамидазная активность, то наблюдалось снижение поглощения на длине волны 450 нм.

После указанной инкубации определяли активность мурамидазы, направленную против *Micrococcus lysodeikticus*, как разницу (Δ) между исходным и конечным (спустя 1 час) значениями поглощения на длине волны 450 нм. Статистическую значимость полученных данных определяли, используя критерий Даннета (пороговый уровень $p = 0,05$) в пакете программ для статистического анализа JMP® v. 12.1.0 (SAS Institute Inc.)

Пример 2. Испытание 1 in vivo на бройлерах

Место проведения эксперимента и животные

Испытания проводились в отделе птицеводства Национального института технологии сельского хозяйства в Пергамино (пров. Буэнос-Айрес, Аргентина) с 15 августа по 3 октября 2017 г. В эксперименте использовали самцов цыплят-бройлеров возрастом 1 сутки (порода Cobb 500), предоставленных товарной инкубаторной станцией (Granja Tres Arroyos, Трес- Арройос 78, пров. Буэнос-Айрес, Аргентина)

Содержание птиц

Птиц содержали в стандартном птичнике (по бокам сетка и занавески) в загонах для напольного содержания цыплят с деревянной стружкой в качестве подстилки. Для обеспечения нужной температуры использовались газовые обогреватели, вентиляторы и увлажнители воздуха.

Всех особей взвешивали, разделяли по массе тела с разницей в 1 г и формировали однородные группы. Особей с крайними значениями массы тела исключали из эксперимента.

Пища и вода предоставлялись без ограничения.

Схема эксперимента

Применяли рандомизированный полноблочный план (факторный эксперимент; энромицин 2 уровня × мурамидаза 2 уровня), 4 варианта воздействия, каждый повторяли 14 раз; для каждого варианта воздействия брали по 252 особи (см. таблицу 3).

Таблица 3. Варианты воздействия

Воздействие	Энрамицин	Мурамидаза
1. Отрицательный контроль	0	0
2. Положительный контроль	10 ppm	0
3. Отрицательный контроль + мурамидаза	0	392 ppm
4. Положительный контроль + мурамидаза	10 ppm	392 ppm

* Активность мурамидазы 63 800 LSU(F)/г

Экспериментальные корма

Основу экспериментальных кормов (стартового корма, корма на ростовой период, финишного корма и корма на последнюю неделю) составляли кукуруза и соевый шрот (главные ингредиенты; см. таблицу 3). Во всех вариантах воздействия использовали фитазу (RONOZYME® HiPhos GT) 1000 FYT на 1 кг корма (100 г на 1 т корма). В качестве витаминно-минерального премикса использовали продукт Rovimix ® broilers (DSM); кокцидиостатиком служил мадурамицин. Состав кормов указан в таблице 4.

Таблица 4. Состав и питательная ценность экспериментальных основных кормов

Ингредиенты (г/кг)	Стартовый период (дни 1-14)	Ростовой период (дни 15-28)	Финишный период (дни 29-42)	Последняя неделя (дни 43-49)
Кукуруза	59,227	64,413	67,427	70,500
Соевое масло	0,187	0,630	0,452	0,367
SBM (43,2%)	35,616	30,521	28,483	25,526
Кормовая ракушка	0,705	0,709	0,712	0,715
Мясо-костная мука	2,884	2,491	1,846	1,912
Кокцидиостатик	0,050	0,050	0,050	0,000
Витаминно-минеральный премикс*	0,200	0,200	0,150	0,150
Соль	0,466	0,399	0,414	0,387
L-лизин х HCl (78,8%)	0,198	0,181	0,123	0,139
DL-метионин (99%)	0,312	0,262	0,220	0,201
L-треонин (98%)	0,095	0,083	0,064	0,063
Холина хлорид (60%)	0,050	0,050	0,050	0,030
Фитаза**	0,010	0,010	0,010	0,010
Показатели питательной ценности				
Сырой белок (%)	22,00	20,00	19,00	18,00
АМЕ (ккал/кг)	3,008	3,084	3,097	3,118
ТМЕ (ккал/кг)	3,258	3,336	3,349#	3,372#

* Витаминно-минеральный премикс Rovimix ® Broilers.

** Ronozyme Hiphos GT производства DSM Nutritional Products.

Энергосодержание на 2% меньше рекомендуемого..

SBM – соевый шрот.

AME – кажущаяся обменная энергия.

TME – истинная обменная энергия.

Провокационные испытания

Условия, создававшие провокационный фактор, влияющий на показатели продуктивности и состояния бройлеров и позволяющий выяснить эффект антибиотика (положительный или отрицательный):

- Повторное использование подстилки (два вывода), влажность которой поддерживается добавлением по 500 мл воды через день до достижения цыплятами возраста 21 день.

- Высокая плотность посадки в загонах (12 особей на 1 м²)

- Уборка верхнего слоя подстилки только на 28-й и 42-й день жизни птиц

Определяемые показатели и методы анализа

Один раз в неделю измеряли массу тела у каждой особи и потребление корма в расчете на загон.

На основании этих данных рассчитывали кормоотдачу и прирост массы тела в каждый период жизни бройлеров и суммарно.

Использовали отношение живой вес/кормоотдача. Это позволяло избежать влияния смертности на результаты при малой численности птиц в загоне (в этом эксперименте – 18 особей на один загон).э

Однородность (доля особей в процентах, по массе тела входящих в диапазон $\pm 10\%$ средней для данного загона массы тела) определяли для каждого загона на 48-й день жизни птиц.

Температуру и относительную влажность регистрировали 1 раз в 30 минут с помощью устройства обегавшего контроля.

Результаты и обсуждение

Масса тела

Когда в корм бройлеров включали энрамицин, у них наблюдался больший прирост массы тела (см. таблицу 5), причем разница становилась значимой на 21-день ($p \leq 0,05$). При включении в корм мурамидазы также отмечалось большее нарастание массы тела у птиц начиная с 21-го дня жизни (на 21-й день $p \leq 0,05$; на 42-й день 42, $p \leq 0,10$). Если в состав корма входили и мурамидаза, и энрамицин, прирост массы тела был больше, чем в случае одной только мурамидазы..

Таблица 5. Масса тела бройлеров (г)

Воздействие	Возраст бройлеров (сут)						
	7	14	21	28	35	42	48
1. Отрицательный контроль	159	418	860	1394	2035	2617	3175
2. Положительный контроль	160	418	866	1402	2097	2752	3305
3. Отрицательный контроль + мурамидаза	159	413	864	1393	2057	2677	3212
4. Положительный контроль + мурамидаза	161	421	883	1425	2099	2762	3354

Коэффициент кормоотдачи

Когда в корм бройлеров включали энрамицин, коэффициент кормоотдачи улучшался (то есть снижался), причем разница становилась значимой начиная с 35-го дня жизни птиц ($p \leq 0,05$; см. таблицу 6). При включении в корм мурамидазы улучшение коэффициента кормоотдачи отмечалось на протяжении всего эксперимента, причем разница была значимой на 7-й день и после 21-го дня жизни особей ($p \leq 0,05$). Если в состав корма входили и мурамидаза, и энрамицин, снижение коэффициента кормоотдачи на протяжении всего эксперимента было больше, чем в случае одного только энрамицина..

Таблица 6. Коэффициент кормоотдачи

Воздействие	Возраст бройлеров (сут)						
	7	14	21	28	35	42	48
1. Отрицательный контроль	0,842	1,160	1,358	1,512	1,647	1,812	1,941
2. Положительный контроль	0,816	1,163	1,348	1,513	1,615	1,761	1,885
3. Отрицательный контроль + мурамидаза	0,802	1,149	1,332	1,501	1,621	1,767	1,893
4. Положительный контроль + мурамидаза	0,800	1,139	1,335	1,494	1,611	1,750	1,854

Отношение масса тела/ кормоотдача

Когда в корм бройлеров включали энрамицин, отношение масса тела/кормоотдача улучшалось (см. таблицу 7), причем разница отмечалась начиная с 21-го дня жизни птиц ($p \leq 0,10$) и становилась значимой начиная с 35-го дня ($p \leq 0,05$). При включении в корм мурамидазы улучшение указанного показателя было больше, чем в случае одного только энрамицина. Эта разница была значимой на 21-й, 42-й и 48-й дни жизни особей ($p \leq 0,05$); на 7-й и 28-й день $p \leq 0,10$.

Таблица 7. Отношение масса тела/кормоотдача

Воздействие	Возраст бройлеров (сут)						
	7	14	21	28	35	42	48
1. Отрицательный контроль	189	361	633	922	1236	1448	1641
2. Положительный контроль	196	360	642	927	1299	1565	1755
3. Отрицательный контроль + мурамидаза	198	360	649	928	1270	1518	1698
4. Положительный контроль + мурамидаза	202	370	662	954	1304	1580	1810

Другие зоотехнические показатели

Когда в корм бройлеров включали энрамицин, наблюдалось сокращение периода достижения забойной массы тела (2800 г) на 1,1 сут ($p \leq 0,05$; см. таблицу 8). При включении в корм мурамидазы масса тела птиц достигала 2800 г на 0,3 сут раньше. На 48-й день жизни особей однородность поголовья в группах разного воздействия не различалась ($p > 0,05$).

Таблица 8. Возраст на момент забоя и однородность поголовья на 48-й день жизни птиц

Воздействие	Возраст достижения массы тела 2800 г*	Однородность поголовья
	сутки	%
1. Отрицательный контроль	43,94	87,03
2. Положительный контроль	42,61	88,09
3. Отрицательный контроль + мурамидаза	43,40	87,40
4. Положительный контроль + мурамидаза	42,38	89,14

Выводы

Результаты, полученные в этом эксперименте, свидетельствуют, что включение в состав корма микробной мурамидазы самой по себе или в сочетании с антибиотиком (энрамицином) эффективно улучшает показатели роста цыплят-бройлеров. Соответственно возможно снижать потребление антибиотиков цыплятами-бройлерами.

Пример 3. Испытание 2 in vivo на бройлерах

План исследования

Испытания кормов проводили с 2400 цыплятами-самцами породы Cobb 400Y в течение 35 суток. Птиц приобрели на товарной инкубаторной станции и в течение испытаний держали в загонах для напольного содержания с подстилкой площадью 6,5x4 фута. Применяли рандомизированный полноблочный план исследования, в соответствии с которым цыплят разделили на 6 групп, различающихся по воздействию, и разместили по загонам. В каждую группу входило 16 загонков по 25 особей в каждом. То есть на каждое воздействие отводилось по 400 цыплят. а всего птиц было 2400.

Воздействия (соответственно, группы) описаны в таблице 9.

Таблица 9. Воздействия

Воздействие		Бацитрацина метилendisалицилат	Мурамидаза
T1	Отрицательный контроль (NC)	0	0
T2	Положительный контроль (PC)	50 ppm	0
T3	NC + Мурамидаза (NB25)	0	450 ppm (25,000 LSU(F)/кг)
T4	PC + Мурамидаза (PB25)	50 ppm	450 ppm (25,000 LSU(F)/кг)
T5	NC + Мурамидаза (NB45)	0	810 ppm (45,000)

			LSU(F)/кг
T6	РС + Мурамидаза (PB45)	50 ppm	810 ppm (45,000 LSU(F)/кг)

Корма

Все корма давали птицам в форме мешанки. Выкармливание проходило в три периода: предстартовый (с 1-го по 14-й день жизни; 500 г на 1 особь), стартовый (с 15-го по 28-й день жизни; 1500 г на 1 особь) и финишный (с 29-го по 35-й день жизни; кормление вплоть до забоя). Для приготовления всех кормов брали сырье из одной партии; каждый корм готовили непосредственно перед началом соответствующего периода выкармливания. Состав кормов отвечал оптимальному соотношению белка с остальными компонентами корма согласно стандартизированной идеальной доступности аминокислот для птиц (см. таблицу 10).

Таблица 10. Состав и питательная ценность экспериментальных основных кормов

	Предстартовый (с 1-го по 14-й день)	Стартовый (с 15-го по 28-й день)	Финишный (с 29-го по 42-й день)
Кукуруза	565	609,6	661,1
Растительное масло	26,1	33	31,360
Обезжиренный соевый жмых (45%)	336,1	289,4	243,9
Мясо-костная мука	40	40	40
Соль	4,666	4,667	4,665
Натрия бикарбонат	1,000	1,000	1,000
Двузамещенный фосфат кальция	10,440	8,51	5,94
Известняка порошок	7,351	5,338	4,349
DL-метионин	3,259	2,671	2,199
L-лизин х HCL	2,187	2,034	2,033
L-треонине	0,659	0,386	0,216
Холина хлорид (75%)	1,000	1,000	1,000
Витаминный премикс	0,500	0,500	0,500
Смесь микроэлементов	1,200	1,200	1,200
Кокцидиостатик (бобенидин 10%)	0,500	0,500	0,500
Нейтрализатор токсинов	1,000	1,000	1,000
Всего	1001	1001	1001
Питательное вещество			
Обменная энергия (ккал/кг)	3000	3100	3150
Белок (%)	22,59	20,77	19,09
Доступный лизин (%)	1,25	1,12	1,01
Доступный метионин (%)	0,64	0,56	0,49
Доступные TSAA (%)	0,929	0,832	0,750
Кальций (%)	0,880	0,760	0,660
Доступный фосфор (%)	0,420	0,380	0,330

Натрий (%)	0,200	0,200	0,200
Доступный треонин (%)	0,829	0,742	0,669
Доступный лейцин (%)	1,734	1,630	1,536
Доступный изолейцин (%)	0,842	0,764	0,690
Доступный валин (%)	0,967	0,865	0,787

TSAА –серусодержащие аминокислоты совокупно (метионин + цистеин)

Вакцинация

Птицам делали стандартную вакцинацию интраокулярным путем против болезни Ньюкасла (на 5-й и 12- день жизни) и против инфекционного бурсита (на 20-й день жизни)

Определяемые показатели

1. Показатели продуктивности и физического состояния (живая масса, среднесуточный прирост живой массы, среднесуточное потребление корма, коэффициент кормоотдачи) определяли в расчете на 1 загон.

2. Европейский индекс эффективности производства (EPEF) рассчитывали следующим образом (ADG – среднесуточный прирост живой массы; FCR – коэффициент кормоотдачи):

$$EPEF = ADG (г) / FCR * 10) \times (100 - \% \text{ смертность})$$

Статистический анализ

Ко всем полученным данным применяли факторный анализ 2 x 3, взяв в качестве основных уровни бацитрацин метилendisалицилата (BMD) 0 ppm и 50 ppm и мурамидазы 0 ppm, 450 ppm и 810 ppm. Определяли основные эффекты и взаимодействия. В статистическую модель включили также другой компонент, а именно эффект помещения, чтобы выяснить, влияет ли как-либо распределение подопытных птиц по двум отдельным помещениям на их продуктивность и состояние. Результаты выражали как среднее и объединенную стандартную ошибку среднего; в тех случаях, когда имелся значительный разброс данных ($P < 0,05$), проводили разделение средних значений, применяя критерий Тьюки (B)..

Результаты

С 1-го по 35-й день жизни особей один раз в неделю отмечали продуктивность/состояние, характеризующиеся приростом массы тела (BWG), потреблением корма (FI) и коэффициентом кормоотдачи (FCR). Как видно из таблицы 11, при включении мурамидазы даже в низкой концентрации (450 ppm) в рацион NC, BWG значительно возрастал по сравнению с NC без этой добавки. Чем больше содержалось в корме PC мурамидазы (от 450 мг/кг до 810 мг/кг), тем больше было увеличение BWG. Также включение в корм PC либо NC мурамидазы в количестве 450 мг/кг приводило к

снижению количества корма, требующегося для прироста живой массы птиц на единицу массы. При этом эффективность использования корма была выше, когда мурамидазу добавляли в корм РС, нежели в корм NC.

Таблица 11. Влияние добавления мурамидазы в корм, содержащий антибиотик, и в корм, не содержащий антибиотик, на продуктивность бройлеров

BWG - прирост массы тела; FI - потребление корма; EPEF - Европейский индекс эффективности производства; NC - отрицательный контроль; PC - положительный контроль; P - вероятность; SEM - стандартная ошибка среднего

^{a b c} разброс значений одного столбца с одинаковым верхним индексом незначительный (P 0,05)

Корма	Мурамидаза	35-й день			
		BWG (г)	FI (г)	FI/BWG	EPEF
NC	0	2090 ^c	3284	1,572 ^{ab}	372,3
PC	0	2074 ^c	3275	1,579 ^a	374,5
NC	450	2141 ^b	3316	1,549 ^c	387,9 ^b
PC	450	2153 ^b	3297	1,531 ^d	398,7 ^a
NC	810	2114 ^{bc}	3301	1,562 ^b	384,9 ^{bc}
PC	810	2206 ^a	3368	1,527 ^d	406,5 ^a
SEM		7,791	10,26	0,003	1,957
Корма	NC	2115	3300	1,561	381,7 ^b
	PC	2144	3313	1,546	393,2 ^a
SEM		9,274	14,201	0,002	2,186
Мурамидаза	0	2082 ^b	3279	1,575 ^a	373,4 ^b
	450	2147 ^a	3306	1,540 ^b	393,3 ^a
	810	2160 ^a	3335	1,544 ^b	395,7 ^a
SEM		11,359	17,393	0,003	2,677
P					
Корма		0,026	0,507	0,001	0,001
Связь		0,001	0,088	0,001	0,001
Взаимодействие		0,003	0,161	0,001	0,042

Взаимодействие между добавкой антибиотика и мурамидазы значительно влияло на EPEF бройлеров с 1-го по 35-й день жизни (см. таблицу 11). Добавление мурамидазы как в корм NC, так и в корм PC в самой низкой из взятых концентраций (450 мг/кг) значительно улучшало показатель EPEF по сравнению с группами птиц, которые не получали этой добавки. При этом EPEF был существенно выше, когда мурамидазу добавляли в корм PC нежели в корм NC

Выводы

На основании данных по продуктивности можно заключить, что добавление в корм цыплят-бройлеров, выращиваемых в провокационных условиях (мясо-костная мука в корме и созревшая подстилка), мурамидазы самой по себе или в сочетании с антибиотиком приводит к значительному увеличению прироста массы тела, повышению

эффективности использования кормов и Европейского индекса эффективности производства по сравнению с птицами, не получающими этой добавки.

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. Композиция, содержащая один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков.

2. Композиция по пункту 1, в которой полипептид, обладающий мурамидазной активностью, является грибной мурамидазой GH24 или GH25.

3. Композиция по любому из пунктов 1 - 2, в которой антибиотик является любым из следующих веществ: бацитрацин, бамбермицин, карбадокс, энрамицин, эндурацидин, лайдломицин, лазалоцид, линкомицин, монензин, неомицин, пенициллин, роксарсон, салиномицин, тилозин и виргиниамицин.

4. Композиция по любому из пунктов 1 - 3, в которой полипептид, обладающий мурамидазной активностью, выбирают из группы, состоящей из:

(a) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 1;

(b) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 2;

(c) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 3;

(d) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 4;

(e) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 5;

(f) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 6;

(g) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 7;

(h) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 8;

меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 67;

(bp) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 68;

(bq) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 69;

(br) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 70;

(bs) полипептида, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95% или 100% идентичного последовательности SEQ ID NO: 71;

(bt) варианта последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, содержащего одну или более замен (предпочтительно консервативных замен) и/или одну или более делеций, и/или одну или более вставок аминокислотных остатков, или любые комбинации указанных изменений в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положениях полипептидной цепи;

(bu) полипептида, содержащего полипептид по пункту (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (w), (x), (y), (z), (aa), (ab), (ac), (ad), (ae), (af), (ag), (ah), (ai), (aj), (ak), (al), (am), (an), (ao), (ap), (aq), (ar), (as), (at), (au), (av), (aw), (ax), (ay), (az), (ba), (bb), (bc), (bd), (be), (bf), (bg), (bh), (bi), (bj), (bk), (bl), (bm), (bn),

(bo), (bp), (bq), (br), (bs) или (bt) и наращение на N- и/или C-конце полипептидной цепи длиной 1-10 аминокислотных остатков; и

(bv) фрагмента полипептида по пункту (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (w), (x), (y), (z), (aa), (ab), (ac), (ad), (ae), (af), (ag), (ah), (ai), (aj), (ak), (al), (am), (an), (ao), (ap), (aq), (ar), (as), (at), (au), (av), (aw), (ax), (ay), (az), (ba), (bb), (bc), (bd), (be), (bf), (bg), (bh), (bi), (bj), (bk), (bl), (bm), (bn), (bo), (bp), (bq), (br), (bs) или (bt), обладающего мурамидазной активностью и составляющего по меньшей мере 90% полной аминокислотной последовательности зрелого полипептида.

5. Композиция по любому из пунктов 1 - 4, в которой антибиотиком является энрамицин или бацитрацин.

6. Композиция по любому из пунктов 1 - 5, которая содержит мурамидазу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и энрамицин или бацитрацин.

7. Корм для животных, содержащий кормовую добавку, один или более источников белка и один или более источников энергии и отличающийся тем, что он также содержит один или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, и один или более антибиотиков.

8. Корм для животных по пункту 7, в котором источник белка выбирают из группы, состоящей из плодов сои, плодов дикой сои, фасоли, люпина, фасоли остролистной, турецких бобов, *Phaseolus filiformis*, лимской фасоли, фасоли многоцветковой, садового (конского) боба, нута, чечевицы, арахиса, испанского арахиса, канадских сортов рапса (канолы), семян подсолнечника, семян хлопка, семян рапса (масличных сортов) или гороха или продуктов переработки указанных источников, например соевого шрота, соевой муки, полножирного соевого шрота, соевого белкового концентрата (SPC), ферментированного соевого шрота (FSBM), подсолнечного шрота, шрота семян хлопка, рапсового шрота, рыбной муки, костной муки, перьевой муки, сыворотки или любых их комбинаций.

9. Корм для животных по пункту 7 или 8, в котором источник энергии выбирают из группы, состоящей из кукурузы, сорго, ячменя, пшеницы, овса, риса, тритикале, ржи, свеклы, сахарной свеклы, шпината, картофеля, маниока, киноа, капусты, проса прутьевидного, проса, африканского проса, итальянского проса или продуктов их переработки, например дробленой кукурузы, картофельного крахмала, маниокового крахмала, дробленого сорго, дробленого проса прутьевидного, дробленого проса, дробленого проса итальянского, дробленого проса африканского или любых их комбинаций.

10. Способ улучшения показателей роста животных, включающий введение животному композиции по любому из пунктов 1-6 или корма по любому из пунктов 7-9.

11. Способ по пункту 10, в котором композицию или корм по данному изобретению дают животному в таком количестве, что оно получает антибиотик в количестве от 0,1 мг до 100 мг на 1 кг корма, например от 0,5 мг/кг до 90 мг/кг, от 1 мг/кг до 80 мг/к, от 5 мг/кг до 70 мг/кг, от 10 мг/кг до 60 мг/кг, от 15 мг/кг до 50 мг/кг или от 20 мг/кг до 40 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

12. Способ по пункту 10 или 11, в котором композицию или корм по данному изобретению дают животному в таком количестве, что оно получает полипептид, обладающий мурамидазной активностью, в количестве от 10 мг до 1000 мг белка-фермента на 1 кг корма, например, от 50 мг/кг до 900 мг/кг, от 100 мг/кг до 800 мг/кг, от 200 мг/кг до 700 мг/кг, от 300 мг/кг до 600 мг/к от или от 400 мг/кг до 500 мг/кг, или любые варианты в указанных интервалах.

13. Способ по любому из пунктов 10-12, в котором животное является животным с однокамерным желудком, например это свиньи (включая, но не только, поросят-сосунов, поросят-отъемышей и свиноматок); домашняя птица, (включая, но не только, домашних индеек, уток, куропаток, цесарок, гусей, голубей, сквобов, кур, бройлеров, цыплят, куриц-несушек, куриц-молодок); домашние питомцы, например кошки и собаки; рыбы (включая, 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, пескарей, карасей, гурами, гарруп и груперов, паракромисов, палтусов и камбал, яванского барбуса, лабео и морулиусов, *Scomberoides lysan*, вьюнов, скумбрий, тунцов и макрель, ханосов и лактаров, герресов и махарр, ильных рыб, кефалей, барабулей, паку и других пираньевых, 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 и сигов) и ракообразные (в том числе, но не только, пильчатые и настоящие креветки).

14. Применение композиции по любому из пунктов 1-6 или корма для животных по любому из пунктов 7-9 при улучшении показателей роста у животных.

15. Способ сокращения применения антибиотиков у животных, включающий введение животному одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной

активностью.

16. Применение одного или более полипептидов, обладающих мурамидазной активностью, при сокращении применения антибиотиков у животных.