



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95266 (13) C2

(51) МПК

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЇ КОРМУ ДЛЯ ТВАРИН ІЗ ФЕРМЕНТАМИ, ЩО ЗНИЖУЮТЬ ІМУННИЙ СТРЕС

1

(21) а200808786
(22) 14.12.2006
(24) 25.07.2011
(86) PCT/US2006/047592, 14.12.2006
(31) 60/750,339
(32) 15.12.2005
(33) US
(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.
(72) АНДЕРСОН ДЕВІД М., US, ХСІАО ХУМГ-Ю, US, ЛІУ ЛІН, US
(73) КЕМДЖЕН КОРПОРЕЙШН, US
(56) WO 03/062409 A2, 31.07.2002
US 6562340 B1, 13.05.2003
US 6558693 B1, 06.05.2003
WO 01/41785 A1, 14.06.2001
WO 99/03497 A1, 28.01.1999
WO 98/20750 A1, 22.05.1998
GB 2261877 A, 02.06.1993
UA 10246 A, 25.12.1996
UA 3013 U, 15.09.2004
(57) 1. Композиція корму для тварин, придатна для перорального введення тварині, яка включає кількість принаймні одного ферменту, що знижує імунний стрес, ефективну для зниження рівня позитивного білка гострої фази в зазначеній тварини, підвищення рівня негативного білка гострої фази в зазначеній тварини та/або поліпшення показників росту тварин у прийнятному для перорального застосування носії, причому
(i) зазначена кількість ферменту становить щонайменше 20 МО ферменту/кг корму;
(ii) за умови присутності одного ферменту, він відрізняється від геміцелюлази типу β-мананази або фосфоліпази;
(iii) зазначений фермент вибраний з групи, що складається з 1,3-β-глюканази, β-глюкозидази, ксилотглюканази, РНКаз L, dsPHK-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканази, α-1,2-фукозидази, α-1,3-1,4-фукозидази, α-1,6-манозидази, α-1,2-манозидази, α-1,3-манозидази, β-1,4-галактозидази, енд-β-N-ацетилглюкозамінази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил-β-глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F),

2

PNGази A, енд-β-N-ацетилглюкозамінази H (ендо H), енд- D, енд- C, α-N-ацетилгалактозоамідази, β-1,3-галактозидази, енд- N-ацилнейрамінідази (ендо N), α-2,3-нейрамінідази, α-2,6-нейрамінідази, α-2,8-нейрамінідази, β-N-ацетилгексозамінази, енд-β-N-галактозидази, енд-α-N-ацетилгалактозоамінази, енд-α-1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α-мананази, α-манозидази, сфінгомелінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β-галактозидази, арабінази, гіалуронидази, α-арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази, лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази.
2. Рідка композиція, придатна для перорального введення тварині, яка включає принаймні один фермент, що знижує імунний стрес, у прийнятному для перорального застосування носії, причому
(i) зазначена композиція містить щонайменше 40000 МО ферменту/л;
(ii) за умови присутності одного ферменту, він відрізняється від геміцелюлази типу β-мананази або фосфоліпази;
(iii) зазначений фермент вибраний з групи, що складається з 1,3-β-глюканази, β-глюкозидази, ксилотглюканази, РНКаз L, dsPHK-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканази, α-1,2-фукозидази, α-1,3-1,4-фукозидази, α-1,6-манозидази, α-1,2-манозидази, α-1,3-манозидази, β-1,4-галактозидази, енд-β-N-ацетилглюкозамінази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил-β-глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F), PNGази A, енд-β-N-ацетилглюкозамінази H (ендо H), енд- D, енд- C, α-N-ацетилгалактозоамідази, β-1,3-галактозидази, енд- N-ацилнейрамінідази (ендо N), α-2,3-нейрамінідази, α-2,6-нейрамінідази, α-2,8-нейрамінідази, β-N-ацетилгексозамінази, енд-β-

(13) C2
(11) 95266
(19) UA

N-галактозидази, ендо- α -N-ацетилгалактозоамінідази, ендо- α -1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α -мананази, α -манозидази, сфінгомієлінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінідази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β -галактозидази, арабінази, гіалуронідази, α -арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази, лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази; та

(iv) якщо зазначений фермент включає 1,3- β -глюканазу, композиція включає щонайменше 155000 МО 1,3- β -глюканази/л.

3. Тверда композиція, придатна для перорального введення тварині, яка включає принаймні один фермент, що знижує імунний стрес, у прийнятному для перорального застосування носії, причому

(i) зазначена композиція містить щонайменше 40000 МО ферменту/кг;

(ii) за умови присутності одного ферменту, він відрізняється від геміцелюлази типу β -мананази або фосфоліпази;

(iii) зазначений фермент вибраний з групи, що складається з 1,3- β -глюканази, β -глюкозидази, ксилотглюканази, РНКаз L, dsPHK-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканази, α -1,2-фукозидази, α -1,3-1,4-фукозидази, α -1,6-манозидази, α -1,2-манозидази, α -1,3-манозидази, β -1,4-галактозидази, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил- β -глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F), PNGази A, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази H (ендо H), ендо D, ендо C, α -N-ацетилгалактозоамінідази, β -1,3-галактозидази, ендо-N-ацилнейрамінідази (ендо N), α -2,3-нейрамінідази, α -2,6-нейрамінідази, α -2,8-нейрамінідази, β -N-ацетилгексозамінідази, ендо- β -N-галактозидази, ендо- α -N-ацетилгалактозоамінідази, ендо- α -1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α -мананази, α -манозидази, сфінгомієлінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінідази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β -галактозидази, арабінази, гіалуронідази, α -арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази, лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази; та

(iv) якщо зазначений фермент включає 1,3- β -глюканазу, композиція включає щонайменше 300000 МО 1,3- β -глюканази/кг.

4. Композиція за п. 1, де композиція являє собою корм для тварин, що включає інгредієнт, який викликає імунну відповідь у тварини, та при цьому фермент містить фермент, що розкладає зазначений інгредієнт.

5. Композиція за п. 4, у якій зазначений інгредієнт являє собою антиген, що представляється патогенним мікроорганізмом.

6. Композиція за п. 3, у якій щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, присутній у кількості щонайменше 80000 МО ферменту/кг.

7. Композиція за п. 3, у якій щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, присутній у кількості щонайменше 160000 МО ферменту/кг.

8. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, у якій фермент включає 1,3- β -глюканазу.

9. Композиція за п. 1, яка включає принаймні 30 МО 1,3- β -глюканази/кг корму.

10. Композиція за п. 2, яка включає принаймні 230000 МО 1,3- β -глюканази/л.

11. Композиція за п. 3, яка включає принаймні 450000 МО 1,3- β -глюканази/кг.

12. Композиція корму для тварин за п. 1, яка включає два або більше ферментів, що знижують імунний стрес, вибраних з групи, що складається з 1,4- β -мананази, 1,3- β -глюканази, β -глюкозидази, ксилотглюканази, РНКаз L, dsPHK-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканази, α -1,2-фукозидази, α -1,3-1,4-фукозидази, α -1,6-манозидази, α -1,2-манозидази, α -1,3-манозидази, β -1,4-галактозидази, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил- β -глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F), PNGази A, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази H (ендо H), ендо D, ендо C, α -N-ацетилгалактозоамінідази, β -1,3-галактозидази, ендо-N-ацилнейрамінідази (ендо N), α -2,3-нейрамінідази, α -2,6-нейрамінідази, α -2,8-нейрамінідази, β -N-ацетилгексозамінідази, ендо- β -N-галактозидази, ендо- α -N-ацетилгалактозоамінідази, ендо- α -1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α -мананази, α -манозидази, сфінгомієлінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінідази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β -галактозидази, арабінази, гіалуронідази, α -арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази, лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази, за умови, що, якщо композиція включає 1,4- β -мананазу і 1,3- β -глюканазу, вона включає принаймні 20 МО 1,3- β -глюканази/кг корму.

13. Рідка композиція за п. 2, яка включає два або більше ферментів, що знижують імунний стрес, вибраних з групи, що складається з 1,4- β -мананази, 1,3- β -глюканази, β -глюкозидази, ксилотглюканази, РНКаз L, dsPHK-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканази, α -1,2-фукозидази, α -1,3-1,4-фукозидази, α -1,6-манозидази, α -1,2-манозидази, α -1,3-манозидази, β -1,4-галактозидази, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил- β -глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F), PNGази A, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази H (ендо H), ендо D, ендо C, α -N-

ацетилгалактозоамідази, β -1,3-галактозидази, ендо-N-ацилнейрамінідази (ендо N), α -2,3-нейрамінідази, α -2,6-нейрамінідази, α -2,8-нейрамінідази, β -N-ацетилгексозамінідази, ендо- β -N-галактозидази, ендо- α -N-ацетилгалактозоамінідази, ендо- α -1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α -мананази, α -манозидази, сфінгомієлінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінідази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β -галактозидази, арабінази, гіалуронідази, α -арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази, лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази, за умови, що, якщо композиція включає 1,4- β -мананазу і 1,3- β -глюканазу, вона включає принаймні 155000 МО 1,3- β -глюканазу/л.

14. Тверда композиція за п. 3, яка включає два або більше ферментів, що знижують імунний стрес, вибраних з групи, що складається з 1,4- β -мананази, 1,3- β -глюканазу, β -глюкозидази, ксиланглюканазу, РНКазу L, dsРНК-специфічної аденозиндезамінази, ЦГ-специфічної рестрикційної ендонуклеази, N-гліканазу, α -1,2-фукозидази, α -1,3-1,4-фукозидази, α -1,6-манозидази, α -1,2-манозидази, α -1,3-манозидази, β -1,4-галактозидази, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил- β -глюкозамініл)аспарагінамідази F (PNGази F), PNGази A, ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази H (ендо H), ендо D, ендо C, α -N-ацетилгалактозоамідази, β -1,3-галактозидази, ендо-N-ацилнейрамінідази (ендо N), α -2,3-нейрамінідази, α -2,6-нейрамінідази, α -2,8-нейрамінідази, β -N-ацетилгексозамінідази, ендо- β -N-галактозидази, ендо- α -N-ацетилгалактозоамінідази, ендо- α -1,6-D-мананази, арабіногалактанази, α -мананази, α -манозидази, сфінгомієлінази, хітинази, хітиндезацетилази, вуглеводдезацетилази, N-ацетилглюкозамінідази, фосфатидилсериндекарбоксилази, сульфатази, β -галактозидази, арабінази, гіалуронідази, α -арабінофуранозидази, хондроїтинази, глюкоцереброзидази, метилестерази, естерази ферулової кислоти, фурулоїлестерази, ацетилестерази, вуглеводдезацетилази, фосфорилхолінгідролази,

лужної фосфатази, кислотної фосфатази, фосфорилхолінестерази та фосфорилхолінфосфатази, за умови, що, якщо композиція включає 1,4- β -мананазу і 1,3- β -глюканазу, вона включає принаймні 300000 МО 1,3- β -глюканазу/кг.

15. Композиція за будь-яким з пп. 12-14, яка включає принаймні один з 1,4- β -мананази та 1,3- β -глюканазу.

16. Композиція за будь-яким з пп. 12-14, яка вибрана з групи, що включає

(i) композицію, що включає 1,4- β -мананазу та хітаназу,

(ii) композицію, що включає 1,4- β -мананазу та ксиланглюканазу,

(iii) композицію, що включає 1,4- β -мананазу та арабіназу,

(iv) композицію, що включає 1,3- β -глюканазу та хітаназу,

(v) композицію, що включає 1,3- β -глюканазу та ксиланглюканазу,

(vi) композицію, що включає 1,3- β -глюканазу та арабіназу,

(vii) композицію, що включає 1,4- β -мананазу, 1,3- β -глюканазу та арабіназу.

17. Композиція за п. 12, яка включає 1,4- β -мананазу та 1,3- β -глюканазу.

18. Композиція за п. 17, яка включає принаймні 30 МО 1,3- β -глюканазу/кг корму.

19. Композиція за п. 13, яка включає 1,4- β -мананазу та 1,3- β -глюканазу.

20. Композиція за п. 19, яка включає принаймні 230000 МО 1,3- β -глюканазу/л.

21. Композиція за п. 14, яка включає 1,4- β -мананазу та 1,3- β -глюканазу.

22. Композиція за п. 21, яка включає принаймні 450000 МО 1,3- β -глюканазу/кг.

23. Композиція за будь-яким з пп. 17-22, яка додатково включає один або більше додаткових ферментів, що знижують імунний стрес.

24. Композиція за будь-яким з пп. 1-23 для застосування при зниженні імунного стресу у тварини.

25. Композиція за п. 24, при застосуванні якої тварині вводять інгредієнт, що викликає імунну відповідь у тварини, і де зазначена композиція включає щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, який розкладає зазначений інгредієнт.

26. Композиція за п. 25, у якій зазначений інгредієнт та зазначений фермент присутні в одній і тій же композиції.

Галузь винаходу

Даний винахід представляє композиції та способи зниження імунологічного стресу та поліпшення характеристик росту тварини. Зокрема, винахід представляє композиції, що містять ферменти, які ефективні в плані зниження імунологічного стресу, або ті, які ефективні в плані лікування або попередження інфекції, або ті, які ефективні для цілей поліпшення показників росту тварини. Винахід

також представляє способи застосування композицій.

Попередній рівень техніки

Тварина може зазнавати імунологічного стресу через ряд причин, включаючи вплив антигену, що розпізнається імунною системою тварини. Антиген може ініціювати імунну відповідь, що являє собою адаптивну імунну відповідь або який являє собою вроджену імунну відповідь. Коли імунна відповідь є ініційованою, тварина зазнає імуноло-

гічного стресу, оскільки її імунна система відповідає на сприйману небезпеку. Часто імунологічний стрес погіршує показники росту тварини.

Білки гострої фази (APP) являють собою білки крові, концентрація яких у крові змінюється, коли тварина зазнає стресу, такого як інфекція, запалення, хірургічна травма або інші внутрішні або зовнішні стимули. Див., наприклад, статтю Murata et al., Vet. J. 168:28 (2004). APP, як вважають, відіграє роль у вродженій імунній відповіді тварини. Наприклад, APP можуть брати участь у відновленні гомеостазу та обмеженні росту мікробів аж до розвинення набутого імунітету.

APP включають "негативні" білки, концентрація яких знижується при стресі, і "позитивні" білки, концентрація яких зростає при стресі. Див., наприклад, статтю Murata et al., вище. Негативні APP включають альбумін та трансферин. Позитивні APP включають білки, що синтезуються гепатоцитами при стимуляції протизапальними цитокінами та вивільнюються в кровоток, наприклад, гаптоглобін, С-реактивний білок, сироватковий амліоїд А, церулоплазмін, фібриноген та α -1-кислий глікопротеїн (AGP). Позапечінкове вироблення APP описане також для більшості видів ссавців. Див. там само. Вважають, що прозапальні цитокіни, такі як інтерлейкін-6 (ІЛ-6) та фактор некрозу пухлини α (ФНП- α), є основними посередниками синтезу APP у печінці. Запалення, інфекція або ушкодження тканини ініціює вивільнення цитокінів клітинами, орієнтованими на захист, викликаючи тим самим синтез APP. Індукція позитивних APP пов'язана також зі зниженням рівня синтезу негативних APP. Див. там само.

Розроблено способи кількісної оцінки APP, та концентрація циркулюючих у кровотоці APP (наприклад, сироваткові рівні APP) корелює з тяжкістю стану тварини. Див. там само. Так, концентрацію APP можна використовувати як індикатор рівня імунного стресу тварини.

Імунна система тварин може розпізнати антигени, які не є реальною загрозою для здоров'я тварини, такі як інгредієнти рослинної та тваринної природи, у композиціях корму для тварин. Дані антигени можуть ініціювати імунну відповідь, таку як вроджена імунна відповідь, приводячи тим самим до того, що тварина зазнає імунологічного стресу. Дану відповідь на стрес можна виявити та контролювати за сироватковою концентрацією APP.

Навіть коли ініціюючий імунітет антиген не представляє реальної загрози для здоров'я тварини, відповідь на стрес може мати несприятливий ефект. Це можна спостерігати, наприклад, як зниження ефективності корму, зменшення швидкості набору маси тіла, підвищення чутливості до інфекції або підвищення температури тіла.

Описано застосування антитіл, таких як антитіла до фосфоліпази А2, для зменшення шлунково-кишкового запалення у тварин. Див., наприклад, Патент США № 6383485. Описано композиції кормів, які містять геміцелюлазу, здатну до розкладання β -манан-вмісної геміцелюлози (наприклад, геміцелюлазу типу β -мананази), таку як енд-1,4- β -мананаза, або фосфоліпазу, таку як

фосфоліпаза А2, для підвищення ефективності кормів. Див., наприклад, WO 97/41739, патент США № 6162473 та патент США № 6183739.

Аналогічним чином описані композиції, що включають фермент, такий як PI-PLC, що розщеплює зв'язок, впливаючи в такий спосіб на вивільнення білку або вуглеводу клітинної поверхні, призначені для лікування або попередження інфекції травного тракту. Див., наприклад, WO 01/41785. У статті Walsh et al., J. Anim. Sci. 73: 1074 (1995) обговорюють композиції кормів, що включають ферменти глюканаз, які розщеплюють змішаний глюкановий субстрат, такі як 1,4- β -глюканаза, що розщеплює змішані β -1,3-, β -1,4-субстрати. Однак у проведених авторами тестах ні PI-PLC, ні 1,4- β -глюканаза не проявляють активності зниження імунного стресу.

Раніше не було опису композиції корму, що включає фермент, який відрізняється від геміцелюлази типу β -мананази або фосфоліпази, та який присутній у кількості, ефективній для зниження імунологічного стресу.

Відповідно існує потреба у композиції та способі зниження імунологічного стресу у тварин.

Розкриття винаходу

Один варіант здійснення представляє композицію, що підходить для перорального введення тварині, що включає фермент, що знижує імунний стрес, у перорально прийнятному носії. Композицію вибирають з групи, що включає: (i) корм для тварин, що містить кількість ферменту, ефективну у плані зниження рівня позитивного білку гострої фази у тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у тварини та/або поліпшення показників росту тварини, (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше 40000 МО (міжнародних одиниць) ферменту/л, та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше 40000 МО (міжнародних одиниць) ферменту/кг. Фермент відрізняється від геміцелюлази типу β -мананази або фосфоліпази, та, якщо фермент містить 1,3- β -глюканазу, композицію вибирають з групи, що включає (i) корм для тварин, що містить щонайменше 20 МО 1,3- β -глюканази/кг корму; (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше 155000 МО 1,3- β -глюканази/л, та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що містить щонайменше 300000 МО 1,3- β -глюканази/кг.

В одному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин, що включає щонайменше 20 МО ферменту/кг корму. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція являє собою тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше 80000 МО ферменту/кг або щонайменше 160000 МО ферменту/кг.

В одному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин, що включає інгредієнт, що викликає імунну відповідь у тварини, та фермент містить фермент, що розкладає даний інгредієнт. В одному варіанті здійснення винаходу інгредієнт являє собою антиген, що представляється патогенним мікроорганізмом.

В одному варіанті здійснення винаходу фермент містить 1,3- β -глюканазу. В одному варіанті здійснення винаходу фермент містить 1,3- β -глюканазу, та композицію вибирають з групи, що включає (i) корм для тварин, що містить щонайменше 30 МО 1,3- β -глюканаз/кг корму; (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що містить щонайменше 230000 МО 1,3- β -глюканаз/л, та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше 450000 МО 1,3- β -глюканаз/кг.

Інший варіант здійснення винаходу представляє композицію, що підходить для перорального введення тварині, яка містить два або більше ферментів, що знижують імунний стрес, причому композиція включає щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, що відрізняється від 1,4- β -мананазу та 1,3- β -глюканазу. Композицію вибирають з групи, що включає: (i) корм для тварин, що містить кількість зазначених ферментів, які знижують імунний стрес, ефективну для зниження рівня позитивного білку гострої фази у зазначеної тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у зазначеної тварини та/або поліпшення показників росту тварини; (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що містить щонайменше один фермент, який знижує імунний стрес, у кількості щонайменше 40000 МО ферменту/л, та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, яка включає щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, у кількості щонайменше 40000 МО ферменту/кг.

В одному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин, що містить щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, у кількості щонайменше 20 МО ферменту/кг корму. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція являє собою тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, яка включає щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, у кількості щонайменше 80000 МО ферменту/кг або щонайменше 160000 МО ферменту/кг.

У спеціальних варіантах здійснення винаходу композицію вибирають з групи, що включає (i) композицію, яка містить 1,4- β -мананазу та хітиназу; (ii) композицію, яка містить 1,4- β -мананазу та ксилотглюканазу, (iii) композицію, яка містить 1,4- β -мананазу та арабіназу, (iv) композицію, яка містить 1,3- β -глюканазу та хітиназу, (v) композицію, яка містить 1,3- β -глюканазу та ксилотглюканазу, (vi) композицію, яка містить 1,3- β -глюканазу та арабіназу, та (vii) композицію, яка містить 1,4- β -мананазу, 1,3- β -глюканазу та арабіназу.

Інший варіант здійснення винаходу представляє композицію, що підходить для перорального введення тварині, що містить 1,4- β -мананазу та 1,3- β -глюканазу. Композицію вибирають з групи, що включає (i) корм для тварин, який включає 1,4- β -мананазу та щонайменше 20 МО 1,3- β -глюканаз/кг корму, (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4- β -мананазу та щонайменше 155000 МО 1,3- β -глюканаз/л та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4- β -

мананазу та щонайменше 300000 МО 1,3- β -глюканаз/кг. В одному варіанті здійснення винаходу композицію вибирають з групи, що включає (i) корм для тварин, що включає 1,4- β -мананазу та щонайменше 30 МО 1,3- β -глюканаз/кг корму; (ii) рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4- β -мананазу та щонайменше 230000 МО 1,3- β -глюканаз/л, та (iii) тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4- β -мананазу та щонайменше 450000 МО 1,3- β -глюканаз/кг. В одному варіанті здійснення винаходу композиція, крім того, включає один або більше додаткових ферментів, що знижують імунний стрес.

Інший варіант здійснення представляє спосіб поліпшення показників росту тварини та/або зниження імунного стресу у тварини, що полягає у введенні тварині кожної з описаних вище композицій.

В одному варіанті здійснення тварині вводять інгредієнт, що викликає імунну відповідь у тварини, та композиція містить щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, що розкладає інгредієнт. В одному варіанті здійснення інгредієнт та фермент вводять у ту саму композицію. В одному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин. В одному варіанті здійснення інгредієнт являє собою антиген, що представляється патогенним мікроорганізмом.

Інший варіант здійснення представляє спосіб попередження або лікування інфекції, пов'язаної з патогенним мікроорганізмом, що представляє антиген, який полягає в пероральному введенні тварині, яка цього потребує, кожної з описаних вище композицій, причому композиція включає щонайменше один фермент, що знижує імунний стрес, який розкладає антиген.

Короткий опис креслень

На Фігурі 1 представлено оптимальну побудовану по крапках криву (та поліноміальне рівняння, що лежить в основі) для розрахунку концентрації курячого α -1-кислотного глікопротеїну (AGP) у зразках плазми курей, що тестують, з використанням даних, отриманих у Прикладі 1.

На Фігурі 2 представлено графік Бокса та Уїскера, що графічно показує рівні AGP у курячій сироватці, отриманій від курей, що тестують, як описано в Прикладі 2. Інтервал даних представлений вертикальними лініями. Прямокутник представляє інтервал, у якому лежать дані, з одним стандартним відхиленням від середнього. Горизонтальна лінія показує середнє дане.

На Фігурі 3 показані рівні AGP сироватки, отриманої від курей, що одержують один з декількох різних кормів, включаючи корми, що відповідають винаходу, та корми, що відповідають попередньому рівню техніки, як описано в Прикладі 3.

На Фігурі 4 представляють оптимальну побудовану по крапках криву (та поліноміальне рівняння, що лежить в основі) для розрахунку концентрації AGP у зразках плазми індичок, що тестують, з використанням даних, отриманих у Прикладі 8.

Детальний опис

Як використовують у наступному описі, слід мати на увазі, що термін "будь-який" охоплює один або більше, поки не визначають інакше.

Як використовують у даному контексті, термін "тварина" відноситься до будь-якої тварини, включаючи людину та інших тварин, таких як тварини, відмінні від людини, у тому числі тварин-компаньйонів, таких як собаки та кішки, худоба, наприклад, корови та інші жуйні тварини, буйвіл, коні, свині, вівці, домашня птиця (наприклад, кури, качки, індички та гусаки) та тварини, що вирощують у аквакультури (наприклад, риба та креветки та вугри).

У даному описі вираз "фермент, що розкладає антиген" та "фермент, що розкладає інгредієнт" означають, що фермент перетворює антиген або інгредієнт у форму, що не розпізнається імунною системою тварини. Здатність ферменту розкласти антиген або інгредієнт можна визначити вимірюванням концентрації сироваткової APP тварини, причому зниження сироваткової концентрації позитивного APP або зниження сироваткової концентрації негативного APP показує, що фермент розклав антиген або інгредієнт.

Як відзначено вище, термін "APP" включає "негативні" білки, концентрація яких знижується при стресі, та "позитивні" білки, концентрація яких підвищується при стресі. Винахід включає композиції та способи, які підвищують концентрацію негативних білків гострої фази, концентрація яких, як правило, знижується при стресі, а також композиції та способи, які знижують концентрацію позитивних білків гострої фази, концентрація яких, як правило, підвищується при стресі. Для зручності в наступному обговоренні винахід ілюструють із посиланням на ефект композицій та способів на позитивні білки гострої фази. Таким чином, термін "APP" у наступному обговоренні, як правило, відноситься до будь-якого одного або більше позитивного білку гострої фази, пов'язаного з відповіддю тварини на стрес. Слід мати на увазі, що композиції та способи, описані в даному контексті, як знижуючі концентрацію "APP" (відносно позитивних білків гострої фази), використовують також для підвищення концентрації негативних білків гострої фази.

Один аспект винаходу відноситься до композиції, що містить фермент, що є ефективним у плані зниження імунологічного стресу, що зазнається твариною. Для зручності дані ферменти позначають у даному контексті як ферменти "знижуючі імунний стрес". Як використовують у даному контексті, термін "фермент, що знижує імунний стрес", означає будь-який фермент, що розкладає антиген або молекулярну структуру, що розпізнається імунною системою людини, наприклад, антиген або молекулярну структуру, що ініціює імунну відповідь, приводячи тим самим до того, що тварина зазнає імунологічного стресу. Термін "молекулярна структура", як використовують у даному контексті, включає загальні молекулярні структури, які зв'язуються рецепторами в контексті вродженої імунної системи, такі як молекулярні структури, які звичайно пов'язані з патогенами.

Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є

геміцелюлазою типу β -мананази. Відповідно до одного аспекту даного варіанта здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є ендо-1,4- β -D-мананазою. Відповідно до іншого варіанту здійснення винаходу фермент не є фосфоліпазою. Відповідно до іншого варіанту здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є 1,4- β -D-глюканазою. Відповідно до іншого варіанту здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є PI-PLC. Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є геміцелюлазою типу β -мананази або фосфоліпазою. Відповідно до ще одного варіанту здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є геміцелюлазою типу β -мананази, не є 1,4- β -глюканазою та не є фосфоліпазою. У відповідності з наступним варіантом здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, не є геміцелюлазою типу β -мананази, не є 1,4- β -глюканазою, не є фосфоліпазою та не є PI-PLC. Відповідно до одного аспекту кожного з вищеповисаних варіантів здійснення фермент не є 1,3- β -глюканазою.

Не бажаючи бути зв'язаними якою-небудь теорією, автори даного винаходу вважають, що розкладання антигену або молекулярної структури ферментом, що знижує імунний стрес, інгібує або знижує рівень імунної відповіді, що ініціюється антигеном або молекулярною структурою, знижуючи в такий спосіб імунологічний стрес у тварини. Зниження рівня імунологічного стресу можна ідентифікувати та контролювати вимірюванням сироваткової концентрації APP у тварини, використовуючи відомі в галузі техніки способи кількісного визначення APP. Приклади даних способів згадуються в статті Murata, et al., див. вище, та описані та згадуються в статтях Hulten et al., Vet. Microbiol. 95: 75 (2003) та Holt et al., див. вище, а також у Прикладі 1, див. нижче.

У зв'язаному варіанті здійснення винахід представляє способи зниження імунологічного стресу у тварини, які полягають у введенні тварині композиції, що містить кількість ферменту, що знижує імунний стрес, ефективну в плані зниження рівня APP у тварини.

Ідентифіковано ряд різних позитивних білків гострої фази, включаючи α -1-кислий глікопротеїн (AGP), церулоплазмін (Cp), білки сімейства колектину (наприклад, легеневі поверхнево-активні білки, конглютинін та манан-зв'язуючий лектин), фібриноген (Fb), C-реактивний білок (CRP), гаптоглобін, інгібітори протеази (наприклад, α -1-антитрипсин, α -1-антихімотрипсин та α -2-макроглобулін) та сироватковий амілоїд-A (SAA). Інші потенційні APP включають ліпополісахарид-зв'язуючий білок (LPB), фосфоліпід-зв'язуючі білки, такі як анексини, та головний білок гострої фази (MAP). Див. статтю Murata, et al., вище. Сироваткові концентрації кожного з даних або інших APP можуть бути використані для ідентифікації, оцінки та контролювання активності ферментів відповідно до винаходу.

Різні APP можуть грати більш істотні ролі у відповідях на стрес різних тварин. Наприклад, AGP,

як відомо, клінічно важливий у великої рогатої худоби та пов'язаний з інфекцією у свиней, собак, кішок та курей (включаючи несучок). СР, як показано, є показником інфекції у великої рогатої худоби, коней та курей. СРР виявлений у жуйних тварин, коней, свиней, собак та кішок, хоча не було продемонстровано, що СРР являє собою АРР у великої рогатої худоби. Показано, що СРР пов'язано з інфекцією у коней та свиней. Fb являє собою надійний показник запалення, бактеріальної інфекції або хірургічної травми у великої рогатої худоби та овець та пов'язаний з інфекцією у коней. Нр являє собою АРР у ряду продуктивних тварин та тварин-компаньйонів, включаючи жуйних тварин, наприклад, велику рогату худобу, овець, свиней, коней та собак. SAA пов'язаний із запаленням та інфекцією у великої рогатої худоби та з інфекцією у коней, свиней, тварин-компаньйонів, таких як собаки, та курей. Підвищення рівнів SAA у молоці виявлено у корів та овець із маститом. Сироватковий LBP пов'язаний з інфекцією у великої рогатої худоби, так само як місцеві рівні анексинів (на поверхнях секреторного епітелію в легенів зараженої великої рогатої худоби). Показано, що MAP є показником інфекції у свиней. Крім того, хоча трансферин звичайно вважають негативним білком гострої фази, він, очевидно, відіграє роль позитивного білку гострої фази у курей. Див. статті Murata, et al., вище; Holt et al., Poultry Sci. 81:1295-1300 (2002). Інші автори також показали, що SAA та Нр, а також СРР та MAP, пов'язані з інфекцією у свиней. Див. статтю Hulten et al., вище.

У деяких варіантах здійснення композиції, що відповідають винаходу, включають кількість ферменту, що знижує імунний стрес, що ефективно в плані зниження сироваткової концентрації АРР у тварини. Кількість може варіюватися залежно від тварини та ферменту, що знижує імунний стрес, та легко може бути визначена компетентним фахівцем в галузі техніки при використанні способів, відомих у даній галузі техніки. Наприклад, рівні сироваткового АРР тварини можна вимірювати до та після введення ферменту або можна зрівняти рівні сироваткового АРР еквівалентних лікованих та контрольних тварин. (У цьому плані може бути корисним зрівняти лікованих та контрольних тварин одного віку, оскільки рівні АРР можуть змінюватися з віком. Наприклад, автори виявили, що рівні сироваткового АРР у курей підвищуються з віком). Зниження концентрації сироваткового АРР, пов'язане із введенням ферменту, показує, що введено ефективну кількість ферменту.

У інших варіантах здійснення композиції, що відповідають винаходу, включають кількість ферменту, що знижує імунний стрес, що ефективно в плані поліпшення показників росту тварини (що називають також "продуктивність по живій масі", зокрема, в галузі птахівництва). Як використовують у даному контексті, вираз "показники росту тварини" включає будь-який параметр, що відбиває ріст тварини, включаючи перетворення кормів, всмоктування води, вміст води у фекаліях, однорідність маси тіла в зграї або групі тварин, життєздатність та смертність. Не бажаючи зв'язувати себе якою-небудь теорією, вважають, що в деяких

умовах ефект ферменту, що знижує імунний стрес, на концентрацію АРР маскується такими факторами, як фактори, що викликають імунний стрес, наприклад, присутність інфекції на низькому рівні в групі тварин або стресові умови життя. У даних умовах фермент, що знижує імунний стрес, проте може бути ефективним у плані поліпшення показників росту тварини. У такий спосіб показники росту тварини являють собою альтернативну міру ефективності композицій та способів, що відповідають даному винаходу.

Композиція може являти собою будь-яку композицію, що підходить для введення тварині. В одному варіанті здійснення винаходу композиція підходить для перорального введення. В одному спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція, що підходить для перорального введення, як правило, визнають безпечною для перорального введення тварині. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція, що підходить для перорального введення, містить тільки інгредієнти та кількості зазначених інгредієнтів, які, як правило, визнають безпечними для перорального введення тварині. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція, що підходить для перорального введення, не містить ніяких інгредієнтів або кількостей зазначених інгредієнтів, які, як правило, не визнаються, як безпечні для перорального введення тварині. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція, що підходить для перорального введення, містить тільки інгредієнти та кількості зазначених інгредієнтів, які дозволені або які не заборонені для перорального введення тварині. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція, що підходить для перорального введення, не містить ніяких інгредієнтів або кількостей зазначених інгредієнтів, які дозволені або які не заборонені для перорального введення тварині.

У деяких варіантах здійснення винаходу композиція включає перорально прийнятний носій для ферменту. Як використовують у даному контексті, вираз "перорально прийнятний носій" включає будь-який фізіологічно прийнятний носій, що підходить для перорального введення. Перорально прийнятні носії включають без обмеження перерахованим композиції кормів для тварин, водні композиції, та рідкі та тверді композиції, що підходять для застосування в кормових продуктах для тварин та/або для перорального введення тварині. Підходящі носії відомі в галузі техніки та включають описані в патенті США 6780628.

У ряді варіантів здійснення композиція являє собою корм для тварин. Як використовують у даному контексті, термін "корм для тварин" має значення, прийняте в галузі тваринництва. Наприклад, корм для тварин включає їстівні матеріали, які споживаються домашньою худобою внаслідок їхньої живильної цінності. Корм для тварин включає харчові раціони, наприклад, композиції, які відповідають харчовим вимогам тварини, та, крім того, включає композиції, які не відповідають харчовим вимогам тварин.

У спеціальних прикладах даного варіанту здійснення кількість ферменту становить щонайменше

приблизно 50000 міжнародних одиниць (МО)/тонну США (907,3 кг) корму, щонайменше приблизно 60000 МО/тонну корму, щонайменше приблизно 70000 МО/тонну корму, щонайменше приблизно 80000 МО/тонну корму, щонайменше приблизно 90000 МО/тонну корму, щонайменше приблизно 100000 МО/тонну корму, щонайменше приблизно 200000 МО/тонну корму або щонайменше приблизно 500000 МО/тонну корму або більше.

В інших спеціальних прикладах винахід представляє корм для тварин, що включає кількість ферменту, що знижує імунний стрес, щонайменше приблизно 20 МО/кг корму, наприклад, щонайменше 20 МО/кг корму, щонайменше 25 МО/кг корму, щонайменше 30 МО/кг корму, щонайменше 35 МО/кг корму, щонайменше 40 МО/кг корму, щонайменше 45 МО/кг корму, щонайменше 50 МО/кг корму або більше. Не бажаючи зв'язувати себе якою-небудь теорією, вважають, що корм для тварин, що включає кількість ферменту, що знижує імунний стрес, щонайменше приблизно 20 МО/кг корму, буде ефективним у плані зниження рівня позитивного білку гострої фази у зазначеної тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у зазначеної тварини та/або поліпшення показників росту тварини.

Таким чином, у деяких варіантах здійснення винахід представляє корм для тварин, що містить кількість ферменту, що знижує імунний стрес, ефективну для зниження рівня позитивного білку гострої фази у тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у тварини та/або поліпшення показників росту тварини.

Композицію корму можна одержати способами, відомими в рівні техніки. Наприклад, фермент, що знижує імунний стрес, можна додати до інших інгредієнтів корму на будь-якій стадії в процесі виробництва, яку вважають підходящою компетентні фахівці в галузі техніки. В одному варіанті здійснення фермент представлений у вигляді розчину, такого як рідкий концентрат ферменту, що додають до інших інгредієнтів корму в процесі виробництва. Альтернативно фермент-вмісний розчин розпорошують на практично кінцеву форму корму для тварин. В іншому варіанті здійснення винаходу фермент представлений у вигляді твердої композиції (такої як порошок), наприклад, тверда композиція, яку додають до інших інгредієнтів корму в процесі виробництва. Приклади способів виготовлення фермент-вмісного корму описані в заявці WO 97/41739.

У ряді варіантів здійснення винаходу композиція відрізняється від корму для тварин. Наприклад, композиція може являти собою рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, або тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин. Дані композиції можуть підходити для безпосереднього введення тварині або можуть бути використані у вигляді добавок у корм (наприклад, що вводять у корм перед годівлею) або кормових добавок (включаючи добавки, які розводять іншими компонентами корму перед годівлею, та добавки, які пропонують тварині у вигляді вільного вибору на роздільній основі). Приклади рідкої композиції, що відрізняється від корму для тварин,

включають рідкі концентрати ферментів, у тому числі рідкі концентрати ферментів, які, як правило, розводять або змішують із іншими інгредієнтами перед пероральним введенням тварині.

У варіантах здійснення винаходу, де композиція являє собою рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, таку як розчин ферменту, рідка композиція або розчин може містити щонайменше приблизно 40000 міжнародних одиниць (МО)/л розчину, наприклад, щонайменше 40000 МО/л, щонайменше 50000 МО/л, щонайменше 60000 МО/л, щонайменше 70000 МО/л, щонайменше 80000 МО/л, щонайменше 90000 МО/л, щонайменше 100000 МО/л, щонайменше приблизно 500000 МО/л, щонайменше приблизно 600000 МО/л, щонайменше приблизно 700000 МО/л, щонайменше приблизно 800000 МО/л, щонайменше приблизно 900000 МО/л, щонайменше приблизно 1000000 МО/л, щонайменше приблизно 2000000 МО/л, або щонайменше приблизно 5000000 МО/л.

У деяких варіантах здійснення кількість рідкої композиції, що відрізняється від корму для тварин, наприклад, приблизно 500 мл розчину наносять або перемішують із кількістю корму, таким як тонна корму, щоб одержати склади кормів з вищеописаними рівнями ферментів. В інших варіантах здійснення кількість рідкої композиції, що відрізняється від корму для тварин, наносять або змішують із кількістю корму для готування корму для тварин з кількістю ферменту, ефективною у плані зниження рівня позитивного білку гострої фази у тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у тварини та/або поліпшення показників росту тварини.

Вважають, що наявні в цей час композиції рідких концентратів ферментів (відмінних від обговорюваних нижче композицій 1,3- β -глюканази), які підходять для перорального введення, містять значно менше, ніж щонайменше приблизно 40000 МО/л ферменту, що знижує імунний стрес, якщо взагалі його містять, та не є ефективними в плані зниження рівня позитивного білку гострої фази, підвищення рівня негативного білку гострої фази та/або поліпшення показників росту тварини при використанні у відповідності зі своїми інструкціями.

У варіантах здійснення винаходу, де композиція являє собою тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, композиція може включати щонайменше приблизно 40000 МО/кг, наприклад, щонайменше 40000 МО/кг, щонайменше 50000 МО/кг, щонайменше 60000 МО/кг, щонайменше 70000 МО/кг, щонайменше 80000 МО/кг, щонайменше 90000 МО/кг, щонайменше 100000 МО/кг, щонайменше 120000 МО/кг, щонайменше 140000 МО/кг, щонайменше 160000 МО/кг, щонайменше 180000 МО/кг, щонайменше 200000 МО/кг або більше.

У ряді варіантів здійснення кількість твердої композиції, що відрізняється від корму для тварин, наносять або змішують із кількістю корму, щоб одержати склади кормів з вищеописаними рівнями ферментів. В інших варіантах здійснення кількість твердої композиції, що відрізняється від корму для тварин, змішують із кількістю корму для одержання корму для тварин з кількістю ферменту, ефек-

тивною у плані зниження рівня позитивного білку гострої фази у тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази у тварини та/або поліпшення показників росту тварини.

Вважають, що наявні в цей час композиції твердих порошкових композицій ферментів, які підходять для перорального введення, містять значно менше, ніж щонайменше приблизно 40000 МО/л ферменту, що знижує імунний стрес, якщо взагалі його містять, та не є ефективними в плані зниження рівня позитивного білку гострої фази, підвищення рівня негативного білку гострої фази та/або поліпшення показників росту тварини при використанні у відповідності зі своїми інструкціями.

Як прийнято в галузі техніки, термін "МО" або "міжнародна одиниця" відноситься до кількості ферменту, що буде каталізувати перетворення мікромолю субстрату у хвилину в умовах, які оптимальні для ферменту. Еквіваленти мас щодо міжнародних одиниць ферментів, що знижують імунний стрес, відомі в галузі техніки та можуть бути визначені при використанні стандартних аналізів. Приклади стандартних аналізів для репрезентативних ферментів, що знижують імунний стрес, наведені нижче.

В одному варіанті здійснення фермент експресується рослиною, що використовують у кормі для тварин. Наприклад, кукурудза може бути піддана генній інженерії, щоб одержати експресію ферменту, що знижує імунний стрес, та отриманий у результаті продукт генетично модифікованої кукурудзи може бути використаний у кормі. На продукцію можна також впливати іншими генетично модифікованими або класичним чином модифікованими системами, таким як бактерії, наприклад, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus*; дріжджі, наприклад, *Pichia*, *Yarrow*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* (наприклад, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Candida*) та інші гриби, такі як *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Tricoderma*, *Penicillium* та *Humicola*.

Відповідно до іншого варіанту здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, являє собою капсулу або таблетку для перорального прийому. Винахід також охоплює варіанти здійснення, у яких фермент вводять іншими шляхами, наприклад, внутрішньо, внутрішньочеревинно або підшкірно у вигляді компоненту композиції, приготовленої для даного застосування відповідно до відомої фармакологічної практики.

Імунна система тварини може розпізнавати як антиген або молекулярну структуру деякі інгредієнти композиції корму, які не представляють реальної загрози для здоров'я тварини. Проте, інгредієнт ініціює імунну відповідь, що приводить до того, що тварина зазнає імунологічного стресу, і який можна виявити та контролювати за підвищенням сироваткової концентрації одного або більше APP. Не бажаючи бути зв'язаними якою-небудь теорією, автори даного винаходу вважають, що дана імунна відповідь, яка "непотрібна та дає зворотний результат", може включати рецептори розпізнавання типу (PRR), такі як беруть участь у вродженій імунній системі.

Вроджена імунна система дає імунну відповідь, що не залежить від розпізнавання специфічного антигену. Див., наприклад, статтю Tosi, J. *Allergy Clin. Immunol.* 116: 241 (2005). Один аспект вродженої імунної системи включає PRR, які розпізнають та зв'язують пов'язані з патогеном молекулярні структури, трансдуцируючи сигнали імунної відповіді. Див. наприклад, Fabrick et al., *J. Biol. Chem.* 279: 26605 (2004). Приклади PRR включають Toll-подібні рецептори (TLR), які розпізнають ряд молекулярних структур та генерують внутрішньоклітинні сигнали для активації ряду відповідей хазяїна. Див., наприклад, статті Tosi, supra; Blach-Olszewska, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 245 (2005). Ідентифіковані PRR/TLR, які розпізнають манозу (див., наприклад, статтю Blach-Olszewska, вище), 1,3- β -глюкан (див., наприклад, статтю Rice et al., *J. Leukoc. Biol.* 72:140 (2002)), ліпополісахарид та фосфорилхолін (див., наприклад, статтю Baumgarth et al., *Semin. Immunopathol.* 26: 347 (2005)), ліпотейхоєву кислоту, розчинний у фенолі модулін, мураміддипептид та пептидоглікан (див., наприклад, статтю Fournier et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 521 (2005)). Описані імуномодуючі рецептори для манану (див., наприклад, статтю Klabunde et al., *Parasitol. Res.* 88: 113 (2002) (манан-зв'язуючий лектин)) та N-ацетил-D-глюкозаміну та N-ацетил-D-манозаміну (див., наприклад, статтю Hansen et al., *J. Immunol.* 169: 5726 (2002)). Ідентифіковані також TLR для дволанцюгової РНК (див., наприклад, статтю Bell et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 102: 10976 (2005)) та ДНК із типами метилювання, які відрізняються від ендогенної ДНК (див., наприклад, статті Huang et al., *J. Immunol.* 175: 3964 (2005); Nonnemacher et al., *Infect. Immun.* 71: 850 (2003)).

Хоча дані молекулярні структури пов'язані з патогенними мікроорганізмами (наприклад, бактеріями, вірусами, грибами та найпростішими), вони також презентуються деякими непатогенними молекулами, такими як інгредієнти корму для тварин. Вроджена імунна відповідь на непатогенні молекули, що презентуються даними молекулярними структурами, зайво піддає тварину імунологічному стресу та може впливати на ефективність корму для тварини, сповільнювати швидкість набору маси тіла тварини або приводити до втрати маси тіла, робити тварину більше чутливою до інфекції, підвищувати температуру тіла тварини або іншим способом впливати на здоров'я тварини або ефективність використання енергії їжі (калорій). Вроджена імунна відповідь, обумовлена функцією MBL (маноза-зв'язуючий лектин), наприклад, індукує сильні відповіді. Показано, що мутація одного з генів білку, що зв'язує манозу, у мишей парадоксальним чином забезпечує виживання після звичайно летального штучно викликаного гострого септичного перитоніту (див. статтю Takahashi, K. et al., *Microbes Infect.* 4 (8): 773-784, 2002). У цьому випадку імунний стрес внаслідок агресивної вродженої імунної відповіді є більш летальним, ніж інфекція.

β -манан являє собою компонент соєвих продуктів та кормів для тварин на соєвій основі. Високомолекулярні форми β -манану, присутні в кормі

для тварини, можуть ініціювати імунну відповідь, яка "непотрібна та дає зворотний результат", тим самим піддаючи тварину імунологічному стресу. Автори даного винаходу виявили, що даний імунологічний стрес можна зменшити або попередити, використовуючи геміцелюлазу типу β -мананази, ендо-1,4- β -D-мананазу, фермент, що розкладає β -манани (наприклад β -галактоманан, β -глюкоманан), тим самим зменшуючи або запобігаючи імунній відповіді на β -манан. Як показано в Прикладах нижче, зниження рівня імунологічного стресу відбувається на зниженні сироваткової концентрації APP.

β -мананазу, що розкладає β -манан, використовують як фермент, що зменшує імунний стрес, відповідно до винаходу, β -манан не вважають геміцелюлозою, оскільки він не має загальних характеристик властивостей геміцелюлоз.

В галузі промислових ферментів термін "геміцелюлаза" використовують як торговельну назву β -мананази. Аналогічним чином у патентах та публікаціях, співавторами яких є автори даної заявки, термін "геміцелюлаза" використовують для позначення β -мананази, у тому числі ендо-1,4- β -D-мананази. Див., наприклад, патент США No. 6162473. В інших контекстах термін "геміцелюлаза" може бути ширше, охоплюючи глюканази та ксиланази на додаток до мананази, як пояснюють нижче.

Термін "геміцелюлоза" створений для опису вуглеводного рослинного матеріалу, отриманого екстракцією розведеним лужним розчином, що гідролізується легше, ніж целюлоза. Див., наприклад, статті Schulze, E., *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 2277 (1891); Schulze, E., *Z. Physiol Chem.* 16: 387 (1892). Відтоді термін "геміцелюлоза" став визначати нерозчинні у воді рослинні полісахариди, пов'язані із целюлозою, відмінні від пектину та крохмалів, та полісахариди в соку рослин, які розчинні в розведених лужних розчинах. Див., наприклад, розділ, написаний Whisler et al., "Hemicelluloses" (Геміцелюлози) у монографії IV POLYSACCHARIDE CHEMISTRY (Хімія полісахаридів) 112 (Academic Press, 1953). Як правило, вважають, що ксилан, β -манани та

галактани являють собою геміцелюлози, хоча деякі β -манани, такі як галактоманани камеді плодів річкового дерева та гуарової камеді добре розчинні. Хвойні дерева містять багато β -мананів, асоційованих із целюлозою, та листяні дерева містять багато ксиланів.

На противагу геміцелюлозам β -манан пов'язаний із клітинними стінками грибів, таких як *Saccharomycetes*, не є структурним компонентом деревини та постійно виявляється в еукаріотичних глікопротеїнах, які, як правило, розчинні у воді. У такий спосіб не вважають, що β -манан являє собою геміцелюлозу, та β -мананаза не є геміцелюлазою. β -мананазу використовують як фермент, що знижує імунний стрес, відповідно до даного винаходу, оскільки вона розкладає β -манани, які розпізнаються імунною системою тварини, але не пов'язані з патогеном. Вроджена імунна система чутлива до манану, оскільки полімери, що містять маннозу, виявлені на поверхні багатьох патогенів.

Інші інгредієнти корму, які може розпізнавати імунна система тварини, включають β -1,3-глюкан (звичайний структурний компонент рослинних матеріалів), N-зв'язані глікопротеїнові комплекси (виявлені, наприклад, у соєвих продуктах), дволанцюгові РНК, виділені з рослин, тварин або мікробів, рослини або тварини із чужорідним (неендогенним) типом мієлірування. Так, відповідно до одного варіанту здійснення винахід представляє композиції, що містять один або більше ферментів, що знижують імунні стреси, які розкладають один або більше даних або інших інгредієнтів корму. У пов'язаному варіанті здійснення винахід представляє способи зменшення імунологічного стресу у тварини, які полягають у введенні тварині композиції, що містить ефективну кількість даного ферменту або ферментів. Специфічні приклади ферментів, що знижують імунний стрес та антигенів, які вони розкладають, наведені в наступній таблиці. Винахід охоплює композиції, які включають інші ферменти, що знижують імунний стрес, які розкладають ті ж самі або інші антигени, а також застосування даних інших ферментів для зниження імунологічного стресу.

Антигени	Ферменти
α -манан	α -мананаза α -манозидаза
β -манани	β -мананаза геміцелюлаза (типу β -мананази) 1,4- β -мананаза ендо-1,4- β -D-мананаза
β -1,3-глюкани	1,3- β -глюканаза ендо-1,3- β -глюканаза (ЕС 3.2.1.39) β -глюкозидаза
Дволанцюгова РНК мРНК без кепи ЗрРНК	Неспецифічна нуклеаза РНКаз L Аденозиндезаміназа, специфічна у відношенні dsРНК
ДНК	ДНКаз Неспецифічна нуклеаза ЦГ-специфічна рестрикційна ендонуклеаза

N-зв'язані глікопротеїни (наприклад, асиалогліко-протеїн)	Карбогідрази N-гліканази Ендоферменти PNGasn
Фосфохолін у сфінгомієліні	Сфінгомієліназа
N-ацетилглюкозамин-вмісний полімер (наприклад, хітин)	хітиназа (ЕС 93.2.2.14) Хітиндезацетилаза Вуглеводдезацетилаза N-ацетилглюкозамінідаза
Фосфатидилсерін	Фосфатидилсеріндекарбоксилаза Фосфоліпаза С Фосфоліпаза D
Сульфатований галактозид-сахарид	Сульфатаза
β-галактозид	β-галактозидаза
Ксилоглюкан	Ксилоглюканаза (ЕС 3.2.1.15)
Ліпоарабіноманан (LAM) Арабіногалактан (AG)	Арабіназа
Гіалуронан (гіалуронова кислота)	Гіалуронідаза (ЕС 3.2.1.35)
Арабіногалактан та інші Арабіно-модифіковані вуглеводні	α-арабінофуранозидаза
Хондроїтинсульфат	Хондроїтиназа
Глюкоцереброзиди	Глюкоцереброзидаза
Складні метилові ефіри вуглеводнів	Метилестераза
Вуглеводи, естерифіковані феруловою кислотою	Естераза ферулової кислоти Фурулоїлестераза
Ацетильований вуглеводневий полімер	Ацетилестераза Вуглеводдезацетилаза

Відповідно до деяких варіантів здійснення винахід представляє композицію, що містить два або більше ферменти, що знижують імунний стрес. В одному варіанті здійснення щонайменше один із двох або більше ферментів не є 1,4-β-мананазою або 1,3-β-глюканазою. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,4-β-мананазу та 1,3-β-глюканазу.

В одному спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин, що містить 1,4-β-мананазу та щонайменше приблизно 20 МО 1,3-β-глюканази/кг корму, наприклад, щонайменше 20 МО/кг корму, щонайменше 25 МО/кг корму, щонайменше 30 МО/кг корму, щонайменше 35 МО/кг корму, щонайменше 40 МО/кг корму, щонайменше 45 МО/кг корму, щонайменше 50 МО/кг корму або більше 1,3-β-глюканази.

В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу, композиція являє собою рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4-β-мананазу та щонайменше приблизно 155000 МО 1,3-β-глюканази/л, наприклад, щонайменше 155000 МО/л, щонайменше 230000 МО/л, щонайменше 300000 МО/л, щонайменше 380000 МО/л або більше 1,3-β-глюканази.

В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає 1,4-β-мананазу та щонайменше приблизно 300000 МО 1,3-β-глюканази/кг, наприклад, щонайменше 300000 МО/кг, щонайменше 450000 МО/кг, щонайменше 600000 МО/кг, щонайменше

750000 МО/кг, щонайменше 900000 МО/кг або більше 1,3-β-глюканази.

В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,4-β-мананазу та ксилоглюканазу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,3-β-глюканазу та ксилоглюканазу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,4-β-мананазу та хітиназу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,3-β-глюканазу та хітиназу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,4-β-мананазу та арабіназу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,3-β-глюканазу та арабіназу. В іншому варіанті здійснення винаходу композиція включає 1,4-β-мананазу, 1,3-β-глюканазу та арабіназу.

Слід мати на увазі, що дані комбінації є тільки ілюстративними, та винахід включає композиції, що містять інші комбінації ферментів, що зменшують імунний стрес. Наприклад, винахід включає композиції, що містять один або більше ферментів, що знижують імунний стрес, перерахованих вище та/або обговорюваних нижче та 1,4-β-мананазу.

Імунний стрес, що викликається інгредієнтом корму, може не завжди являти собою відповідь вродженої імунної системи. Добре відомо, що в деякого невеликого відсотку дітей, яких годують заміном жіночого молока на основі соєвого білку, розвивається сильна несприятлива кишкова реакція на імунологічній базі (див. звіт Комітету з харчуванню Американської академії педіатрії,

Pediatrics 101 (1): стор. 148, (1998)). N-зв'язані глікопротеїни сої, наприклад, β -конгліцинін, що іноді називають 7S глобуліном (див. статті Ogawa T, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(5): 831-833, 1995; Burks AW, et al., J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 8(2): 195-203, 1989), можуть являти собою сильні антигени, та визнають, що вони мають антиживильні властивості, β -конгліцинін навмисно видаляють із препаратів ізолятів соєвого білку, використовуваних для харчових добавок, незважаючи на його внесок у загальний білок. Гідроліз руйнує антигенність. Крім того, автори виявили, що збагачена 7S фракція соєвого глікопротеїну при використанні для годівлі самців птахів, переварювалася гірше, ніж інша менш глікозильована фракція соєвого білку.

Приклади придатних ферментів для розкладання вуглеводів в N-зв'язаних глікопротеїнах, включають α -фукозидази, такі як α -1,2-фукозидаза та α -1,3-1,4-фукозидаза, α -манозидази, такі як α -1,6-манозидаза, α -1,2-манозидаза, та α -1,3-манозидаза, β -1,4-галактозидаза, енд- β -N-ацетилглюкозамінідаза F (ендо F), пептид-N-(N-ацетил- β -глюкозамініл)аспарагінамідаза F (PNGаза F), PNGаза A, енд- β -N-ацетилглюкозамінідаза H (ендо H), енд- β -D, енд- β -C, α -N-ацетилгалактозамінідаза, β -1,3-галактозидаза, енд-N-ацил-нейрамінідаза (ендо N), α -2,3-нейрамінідаза, α -2,6-нейрамінідаза, α -2,8-нейрамінідаза, β -N-ацетилгексозамінідаза, енд- β -N-галактозидаза, енд- α -N-ацетилгалактозамінідаза, енд- α -1,6-D-мананаза, арабіногалактаназа, α -галактозидаза, β -галактозидаза.

Дані ферменти відомі у рівні техніки та деякі доступні з комерційних джерел. Альтернативно ферменти, що знижують імунний стрес, можна одержати з мікроорганізмів, які продукують ферменти, таких як бактерії, гриби та дріжджі. Крім того, ферменти можна одержати при використанні методів рекомбінантної технології, відомих в галузі техніки, шляхом, наприклад, генетичної інженерії клітини-хазяїна з метою одержання продукції ферменту, наприклад, викликаючи транскрипцію та трансляції гену, що кодує фермент. Послідовності амінокислот ряду наведених вище ферментів відомі в галузі техніки. Використовуючи дані послідовності або відомі нуклеотидні послідовності, що кодують дані послідовності, компетентні фахівці в галузі техніки можуть сконструювати підходящі гени для рекомбінантної експресії ферментів. Крім того або альтернативно, нуклеотидну послідовність, що кодує відомий фермент, що знижує імунний стрес, можна використовувати для зондування бібліотеки ДНК із метою ідентифікації інших нуклеотидних послідовностей, що кодують ферменти, що знижують імунний стрес. Як відомо в галузі техніки, дану бібліотеку ДНК можна виділити з певного організму або популяції організмів або можна одержати із природних джерел і, таким чином, представити ДНК із мікроорганізмів, які важко культивувати.

У варіантах здійснення винаходу, де композиція включає комбінацію ферментів, фермент мож-

на одержати в індивідуальній формі шляхом розділення організмів, або два або більше ферменти можуть продукуватися одним організмом. Наприклад, один організм можна сконструювати рекомбінантно з метою одержання двох або більше ферментів способами, відовими в галузі техніки.

Як обговорюється вище, імунна система тварини розпізнає ряд молекулярних структур, що продукуються патогенними мікроорганізмами, включаючи ліпополісахарид (наприклад, асоційований із грам-негативними бактеріями), бактеріальні жгутики, що містять консервативний білок флагелін, пептидоглікан (наприклад, асоційований із грам-позитивними бактеріями), ліпотьохсову кислоту (наприклад, асоційовану із грам-позитивними бактеріями), зв'язану лектином L-фіколіном C-типу (див. статтю Lynch, N. J., et al., J. Immunology 172: 1198-1202, 2004), фосфорилхолін (наприклад, асоційований із грам-позитивними та грам-негативними бактеріями), ДНК (таку як бактеріальна ДНК із неметильованими фрагментами Cp, див. статтю Van Uden та Raz, J Allergy Clin Immunol. 104(5):902-10, 1999.) та дволанцюгову РНК та ЗрРНК (див. статтю Horigaung, et. al., Science 314: 994-997, 2006). Імунна відповідь на дані молекули включає підвищення рівня сироваткового APP.

Інші патогенні молекулярні структури включають молекули, що містять N-ацетилглюкозамін та молекули, що містять N-ацетилманозамін. Точна специфічність зв'язування всіх колектинів може бути невідомою (маноза-зв'язуючий лектин являє собою колектин або лектин C-типу), але зв'язування з рядом різних бактеріальних патогенів спостерігають наприклад, у H-фіколіну, пов'язаного з поверхнево-активною речовиною білку A (SP-A) та конглютиніну. Сполуки, подібні N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилманозаміну можуть інгібувати зв'язування і, таким чином, як припускають, є частиною специфічності зв'язування розпізнаваної структури (див. статтю Naugum, J.S., et al., Biochemical J. 293 (3): 873-878, 1993).

Приклади інших антигенів та молекулярних структур, які можуть являти собою мішень для розкладання ферментом відповідно до винаходу, включають бактеріальні ліпопротеїни (див. статтю Hacker, H. et al., J. Exper. Med. 192 (4): 595-600, 2000); β -1,3-глюкан, що зв'язується колектином дектином-1 (Adachi, Y., et al., Infection and Immunity 72 (7): 4159-4171, 2004); флагелін (який зв'язує TLF5) (див. статтю Honko, A.N., i Mizel, S.B., Immunol. Res. 33 (1): 83-101, 2005); глікокон'югати фукозилу, α -Gal-церамід, фібриноген, гепаринсульфат, сульфатований gal-сахарид, хітозан N-ацетилглюкозамін; асialogлікопротеїн та β -галактозида.

Клас рецепторів, що називають фагоцитарними рецепторами (SR), структурно близький ряду рецепторів вродженої імунної відповіді та може привести до імунного стресу. Вважають, що SR включено в повторний цикл та очищення в апоптозних або в іншим способом uszkodжених клітинах. Фагоцитарні рецептори (SR), що експресуються макрофагами та дендритними клітинами, також являють собою рецептори для вродженої імунної

системи. Більше того, деякі SR розпізнають патогени, та показано, що ряд вроджених імунних рецепторів важливі при апоптозі. Так, відповідно до одного варіанта здійснення винаходу молекулярні структури, що є мішенями зв'язування SR, направлені на розкладання ферментом.

Одна з даних мішеней зв'язування молекулярних структур являє собою окислений ліпопротеїн низькою густини (ЛНГ). Рецептори, що називають LOX-I (див. статтю Peiser, L., et al., *Current Opinion in Immunology* 14:123-128, 2002) SR-PS OX/CXCL-16 (див. статтю Fukumoto, N., et al., *J. Immunol.* 173(3): 1620-1627, 2004) та CD36 (див. статтю Bruni, F., et al., *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 119(4): 417-28, 2005) зв'язують окислений ЛНГ, що може бути присутнім у ряді кормів, зокрема, кормів, що містять борошно із субпродуктів тварин, таке як кров'яне борошно.

Інша молекулярна структура, що є мішенню зв'язування SR являє собою фосфатидилсерин (PS) та лізофосфатидилсерин (лізо PS). SR для PS включає SR-PSOX/CXCL-16 та інші рецептори PS (див. статтю Schlegel, R.A. i Williamson, P., *Cell Death Differ.* 8 (6): 545-548, 2001). Вплив фосфатидилсерінових фосфоліпідів може привести до запальних реакцій, та вважають, що фосфатидилсерінові фосфоліпіди присутні на деякому рівні в більшості кормів.

Гіалуронан переважає в позаклітинних рідинах тварин, але також розпізнається механізмами вродженої імунної/фагоцитарної системи, наприклад, при загосненні ран. Див., наприклад, статтю Jameson, et al., *J. Expt. Medicine* 210 (8): 1269-1279, 2005. Курячі гребінці є комерційним джерелом гіалуронану, що звичайно використовують у формі очищеної гіалуронової кислоти. Так, корм для птаха, зроблений із субпродуктів обробки м'яса, може містити гіалуронан, часто у великих кількостях. Гіалуронідазу (ЕС 3.2.1.35), що розкладає гіалуронан та гіалуронову кислоту, використовують як фермент, що знижує імунний стрес, відповідно до винаходу, особливо в контексті тварин, які одержують корм із птаха. Наприклад, гіалуронідазу використовують для зниження імунного стресу, асоційованого з годівлею їжею із птаха.

Ферменти, які розкладають кожну з даних молекулярних структур, тим самим інгібують або знижують рівень імунної відповіді, у такий спосіб знижуючи імунологічний стрес у тварини. Наприклад, відомі ДНКазі та неспецифічні нуклеазі, які розкладають дволанцюгову РНК та бактеріальну ДНК. Відомі ферменти рестрикційні ендонуклеазі, специфічні у відношенні метильованих фрагментів ЦГ у ДНК нессавців. Ферменти, які розкладають фосфорилхолін, включають фосфорилхолінгідролазу, лужну фосфатазу, кислу фосфатазу, фосфорилхолінестеразу та фосфорилхолінфосфатазу.

Дане зниження стресу можна виявити та контролювати вимірюванням рівня сироваткового APP, як описано вище, причому знижені концентрації сироваткового APP відбивають знижений імунологічний стрес.

Як відзначено вище, композиція включає кількість ферменту, що знижує імунний стрес, яка

ефективна в плані зниження рівня білку гострої фази у тварини. Дана кількість може варіюватися від тварини до тварини та від ферменту до ферменту, але може бути легко встановлена компетентними фахівцями в галузі техніки, наприклад, вимірюванням рівнів APP, як описано вище. Наприклад, рівні сироваткового APP тварини можна вимірювати до та після введення ферменту або можна зрівняти рівні сироваткового APP лікований та контрольних тварин. У варіантах здійснення, де ефективну кількість оцінюють вимірюванням рівнів сироваткового APP до та після введення ферменту, наступне вимірювання можна зробити через щонайменше приблизно один день до щонайменше приблизно декількох днів або більше після вихідного введення ферменту. Зниження концентрації сироваткового APP, пов'язане із введенням ферменту, показує, що вводять ефективну кількість ферменту. Однак слід мати на увазі, що рівні APP, як правило, знижуються в міру того, як адаптивна імунна відповідь тварини дає ефект.

Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід представляє композицію, що включає 1,3-β-глюканазу в кількості, ефективній для ефективного зниження рівня позитивного білку гострої фази в зазначеній тварини, підвищення рівня негативного білку гострої фази в зазначеній тварини та/або поліпшення показників росту тварини. В одному специфічному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою корм для тварин, що включає щонайменше приблизно 20 МО 1,3-β-глюканази/кг корму, наприклад, щонайменше 20 МО/кг корму, щонайменше 25 МО/кг корму, щонайменше 30 МО/кг корму, щонайменше 35 МО/кг корму, щонайменше 40 МО/кг корму, щонайменше 45 МО/кг корму, щонайменше 50 МО/кг корму, або більше 1,3-β-глюканази. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше приблизно 155000 МО 1,3-β-глюканази/л, наприклад, щонайменше 155000 МО/л, щонайменше 230000 МО/л, щонайменше 300000 МО/л, щонайменше 380000 МО/л, або більше 1,3-β-глюканази. В іншому спеціальному варіанті здійснення винаходу композиція являє собою тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин, що включає щонайменше приблизно 300000 МО 1,3-β-глюканази/кг, наприклад, щонайменше 300000 МО/кг, щонайменше 450000 МО/кг, щонайменше 600000 МО/кг, щонайменше 750000 МО/кг, щонайменше 900000 МО/кг або більше 1,3-β-глюканази.

У деяких варіантах здійснення корму для тварин, де фермент містить 1,3-β-глюканазу, фермент може бути присутнім у кількості, що становить щонайменше приблизно 100000 МО на тонну корму.

Дані кількості значно вище, ніж вміст 1,3-β-глюканази в комерційних ферментних добавках для кормів та комерційно доступних кормах, які були проаналізовані авторами даного винаходу, та було показано, що вони містять максимум від приблизно 10000 МО/тонну корму, приблизно 72500 МО/л некрормової рідкої композиції або приблизно 150000 МО/кг некрормової твердої композиції. Ав-

тори даного винаходу вважають, що 10000 МО/тонну корму 1,3- β -глюканаз не було б ефективним для зниження рівня APP, та експериментально підтверджують дану думку. Крім того, автори даного винаходу експериментально встановили, що комерційні продукти, такі як Avizyme (Danisco A/S, Langebrogade 1, Dk-1001, Copenhagen, Denmark) та Rovobio (Adisseo France SAS, 42, Avenue Aristide Briand, BP100, 92164 Antony Cedex,) та комерційні корми, що містять стандартні кількості β -1,3-1,4-глюканаз (Brewzyme BG plus, Dyadic International, 140 Intracoastal Pointe Drive, Suite 404, Jupiter, Florida 33477-5094), ксиланаз (Multifect XL, Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA), PI-PLC (ChemGen Corp., 211 Perry Parkway, Gaithersburg, MD) та амілази (Амілаза FRED, Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA) не знижують рівень APP. Див. Приклад 3 нижче та Фігуру 3. У випадках, коли є активність 1,3- β -глюканаз, вона знаходиться у вищевказаних низьких межах та неефективна в плані зниження рівня AGP.

В іншому варіанті здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, представлений як компонент композиції, що включає також сполуки, що містять антиген або молекулярну структуру, які розкладаються ферментом. Наприклад, винахід включає корм для тварин, що містить β -1,3-глюкан та 1,3- β -глюканазу, корм для тварин, що містить ДНК або дволанцюгову РНК та ДНКазу та/або неспецифічні нуклеази, корм для тварин, що містить N-зв'язаний глікопротеїн, та ендо- або екзокарбогідразу, N-гліканазу або PNGазу або будь-який з інших вищенаведених ферментів. Інші придатні комбінації антигенів та ферментів, що знижують імунний стрес, будуть очевидні для компетентних фахівців в галузі техніки та охоплюються винаходом.

У даному варіанті здійснення винаходу очікують, що рівні сироваткового APP будуть залишатися підвищеними так довго, як будуть вводити композицію. Таким чином, якщо ефективну кількість ферменту, що знижує імунний стрес, оцінюють вимірюванням рівнів сироваткового APP до та після введення ферменту, наступне вимірювання можна робити через кілька днів або тижнів після вихідного введення ферменту.

Як відзначено вище, винахід включає способи зниження імунного стресу у тварини, що включають введення тварині композиції, що містить фермент, що знижує імунний стрес, у кількості, ефективній для зниження рівня білку гострої фази у тварини. Композиція може являти собою кожну з вищеповисаних композицій, включаючи пероральну композицію, таку як корм для тварин, рідка композиція, відмінна від корму для тварин, або тверда композиція, відмінна від корму для тварин. Тварина може являти собою будь-яку тварину, включаючи людину, та може бути здоровою твариною або твариною, що страждає від інфекції або іншого захворювання або стану.

Винахід включає також способи поліпшення показників росту тварини, що полягають у введенні тварині композиції, що містить фермент, що

знижує імунний стрес. У ряді варіантів здійснення винаходу композиція включає кількість ферменту, що знижує імунний стрес, ефективну в плані поліпшення показників росту тварини. Композиція може являти собою кожну з вищеповисаних композицій, включаючи пероральну композицію, корм для тварин, рідку композицію, що відрізняється від корму для тварин, або тверду композицію, що відрізняється від корму для тварин. Тварина може являти собою будь-яку тварину, включаючи людину, і може бути здоровою твариною або твариною, що страждає від інфекції або іншого захворювання або стану.

В одному варіанті здійснення фермент експресується рослиною, що використовують у кормі для тварини. Наприклад, кукурудзу можна піддати генетичній інженерії, щоб вона експресувала фермент, що знижує імунний стрес, та отриманий у результаті продукт генетично модифікованої кукурудзи можна використовувати в кормі.

В одному варіанті здійснення винаходу тварині вводять фермент, що знижує імунний стрес, та, крім того, вводять антиген (наприклад, молекулу, що містить структуру, що розкладається ферментом). Фермент та антиген можна вводити окремо або одночасно у вигляді частини однієї й тієї ж або різних композицій. В одному варіанті здійснення тварині винаходу вводять корм, що містить антиген або вміщуючу структуру молекулу та окремо вводять композицію, що містить фермент, що знижує імунний стрес. В іншому варіанті здійснення тварині вводять корм, що містить антиген або вміщуючу структуру молекулу та кормову добавку, що містить фермент. В іншому варіанті здійснення тварині вводять корм, що містить як антиген, так і фермент.

Інший аспект винаходу представляє композиції та способи зниження імунологічного стресу шляхом попередження та лікування інфекції, що викликається патогенними мікроорганізмами. Іноді тварини споживають композиції, такі як вода або корм для тварин, які містять патогенні мікроорганізми (наприклад, бактерії, віруси, гриби та найпростіші), або іншим способом піддаються впливу даних патогенів. Даний винахід представляє композиції, що містять фермент, що розкладає ключові компоненти патогенних мікроорганізмів (тобто, "патогенний компонент"), у кількості, ефективній для зниження рівня інфекції, та, внаслідок цього, рівня APP, що експресується твариною, що відповідає на інфекцію. Композицію використовують для зниження імунологічного стресу шляхом попередження або зведення до мінімуму інфекції, тим самим знижуючи імунологічний стрес, що викликається безпосередньо патогеном. В одному конкретному аспекті даного варіанту здійснення винахід представляє спосіб попередження та лікування інфекції травного тракту.

Ферменти можуть також лікувати або попереджати інфекцію за допомогою розкладання компонентів патогену. Це обумовлено тим, що при розкладанні патогенного компоненту патоген може втрачати свою здатність інфікувати хазяїна. Дане зниження даної інфекції привело б у результаті до зниженого імунного стресу та зниження рівня си-

роваткового APP за допомогою іншого механізму, ніж описаний вище, але практично невідрізнимого в плані спостережуваного зниження рівня APP. Є щонайменше три варіанти, при яких лікування ферментами могло б привести до позитивного результату. Якщо молекулярна структура патогену, що розкладається ферментом, бере участь у зв'язуванні патогену із клітинами-хазяїнами, першої стадії, що вимагається для інфекції, або в будь-якій іншій стадії, необхідній для успішної інфекції, то лікування ферментами могло б допомогти. Альтернативно можна модифікувати зв'язуючу структуру на клітині-хазяїні. Наприклад, показано, що ряд бактеріальних та протозойних патогенів взаємодіє із протеогліканами на поверхні еукаріотичної клітини-хазяїна, особливо із сульфатованими протеогліканами (див. статтю Flekenstein, J.M. et al., *Infection and Immunity* 70 (3): 1530-1537, 2002). Застосування ферментів, таких як гепариназа та N-ацетилглюкозамін-4-сульфатаза або арилсульфатази, могло б знизити рівень взаємодії та інфекції.

У другому варіанті молекулярна структура патогену, що розкладають, могла б являти собою токсин, що порушує метаболічні функції клітини-мішені. У третьому варіанті патогенний компонент, що розкладається ферментом, міг би брати участь у механізмі патогену, спрямованому на запобігання імунної відповіді хазяїна. У патогенів виявлені численні механізми запобігання імунної відповіді, починаючи від імітації зовнішньої поверхні клітин-хазяїв для інгібування імунної відповіді, наприклад, реакцій комплекменту та апоптозу. Зниження або попередження інфекції можна також оцінити вимірюванням сироваткового APP, причому більш високі рівні APP асоціюються із інфекцією.

Ферменти, які розкладають патогенні компоненти, такі як описані вище, відомі в галузі техніки. Наприклад, показано, що ендосіалідаза, виділена з бактеріофага, попереджає летальність при системній інфекції *E. coli* K1 у щурів шляхом розкладання капсули PSA (полісіалової кислоти) на поверхні бактерій. Хоча розкладання капсульного вуглеводню не робить впливу на життєздатність *E. coli* *in vitro*, втрата капсули *in vivo* дозволяє імунній системі хазяїна розпізнавати та боротися з інфекцією, крім летального результату (див. статтю Mushtaq, N., et al. *Antimicrobial Agents and ChemoTherapy* 48(5): 1503-1508, 2004). Капсула PSA дає можливість поверхні *E. coli* виглядати подібно клітині-хазяїнові, у такий спосіб уникаючи вроджених імунних відповідей хазяїна. Іншим відомим ферментом, використовуваним у даному винаході, є гепариназа I (Нейтралаза, Ihex Technologies, Canada). Багато ферментів є в комерційних джерелах або можуть бути отримані з мікроорганізмів, які продукують ферменти, таких як бактерії та гриби, у тому числі дріжджі, або можуть бути отримані рекомбінантним шляхом, як обговорюється вище.

Необхідні ферменти можна одержати технологіями рекомбінантної ДНК, коли відомий ген, що кодує фермент. Розвиток методів швидкого секвенування ДНК привело в результаті до створення більших загальнодоступних баз даних послідовно-

стей білків та їхніх кодуючих генів, таких як NCBI Genbank. Використовуючи метод швидкого секвенування, наприклад, з 454 Life Sciences (454 Life Sciences, 20 Commercial Street, Branford, CT 06405), можна секвенувати типовий бактеріальний геном протягом чотирьох годин. Раніше невідомий ген нового необхідного ферменту з геному можна одержати зондуванням геному з використанням, наприклад, раніше ідентифікованих кодуючих послідовностей ферментів того ж самого типу або подібних типів, описаних з комерційних або загальнодоступних баз даних, використовуючи легкодоступні комп'ютерні програми, такі як Blast. Компетентні фахівці в галузі техніки можуть ідентифікувати в геномі ДНК, що має граничний рівень гомології з відомою послідовністю та інші властивості ділянки, що кодує ген, та потім виділити та ампліфікувати ген, використовуючи, наприклад, спосіб полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Потім ген можна експресувати у хазяїні, та можна підтвердити його ферментні властивості необхідного білку.

Якщо необхідна активність ферменту заздалегідь невідома, її можна визначити, використовуючи стандартні мікробіологічні способи збагачення, засновані на підборі за ростом на субстраті. Мікроби, що використовують субстрат як єдине джерело вуглецю або азоту, повинні експресувати ферменти, здатні розкласти сполуку-мішень. Для розробки економічного одержання існує можливість вибору підвищення вироблення даного ферменту з використанням класичних мутаційних/селекційних методів та методів збагачення стосовно до мікроорганізму-продуцента або за допомогою методів експресії рекомбінантної ДНК, добре відомих в галузі техніки.

Композиція, що включає фермент, який знижує імунний стрес, що розкладає патогенний мікроорганізм, може являти собою будь-яку композицію, що підходить для введення тварині, включаючи композиції, що підходять для перорального введення тварині, як описано вище. Як відзначено вище, композиція може включати кількість ферменту, що ефективна в плані зниження рівня позитивного білку гострої фази (або підвищення рівня негативного білку гострої фази) у тварини та/або поліпшення показників росту тварини. Дана кількість може варіюватися від тварини до тварини та від ферменту до ферменту, але може бути легко встановлена компетентними фахівцями в галузі техніки, наприклад, вимірюванням рівнів APP та/або контролюванням показників росту тварини, як описано вище та як відомо в галузі техніки.

В одному варіанті здійснення фермент, що знижує імунний стрес, що спрямований на патогенний антиген, представлений як компонент корму для тварин. В одному прикладі даного варіанту здійснення винаходу кількість ферменту становить щонайменше приблизно 100000 МО/тону корму.

В іншому варіанті здійснення винаходу фермент, що знижує імунний стрес, що спрямований на патогенний антиген, представлений як компонент композиції, що також включає патогенний антиген. Наприклад, винахід включає корм для тварин, що містить (А) патогенний мікроорганізм,

що представляє антиген, такий як ліпополісахарид, пептидоглікан, ліпотейхоева кислота, фосфорилхолін, дволанцюгова РНК та ДНК, та (В) та фермент, що розкладає антиген. Патогенні організми можуть проникнути в корм внаслідок самої природи антисанітарних умов, обумовлених високою щільністю вирощування тварин в умовах їх виробництва.

Як відзначено вище, винахід включає способи зниження імунного стресу у тварини та/або поліпшення показників росту тварини, що полягають у введенні тварині композиції, що містить фермент, що знижує імунний стрес. В одному варіанті здійснення тварині вводять фермент, що знижує імунний стрес, що розкладає патогенний антиген, та, крім того, вводять патогенний антиген. Фермент та антиген можна вводити окремо або одночасно у вигляді частини однієї й тієї ж або різних композицій. В одному варіанті здійснення винаходу тварині вводять корм, що містить антиген, та окремо вводять композицію, що містить фермент. В іншому варіанті здійснення тварині вводять корм, що містить антиген та кормову добавку, що містить фермент. В іншому варіанті здійснення тварині вводять корм, що містить як антиген, так і фермент.

Наступні приклади далі ілюструють винахід, але винахід не обмежений спеціальними прикладами варіантів здійснення.

Приклад 1

Корм для тварин, що містить геміцелюлазу (ендо-1,4-β-мананазу) одержують та вводять курям та вимірюють рівні AGP, як більш детально описано нижче.

У цілому 4000 однодобових курчат Cobb X Cobb чоловічої статі розподіляють випадковим чином на 8 експериментальних груп лікування, та кожен варіант лікування здійснюють в 10 повторях:

План експерименту	8 груп лікування
Загальна кількість загонів	80
Загальна кількість груп лікування	8
Кількість птахів/загін	50
Кількість загонів/групу лікування	10
Кількість птахів/групу лікування	500

Дві з восьми груп лікування включають ферменти, що знижують стрес, відповідно до винаходу: Група лікування 3 (мананаза у формі упареного бульйону із цільних клітин, отриманого при ферментації *B. lentus*, внесеного в концентрації приблизно 100 MU/тонну в основні дієти) та група лікування 6 (мананаза у формі безклітинного центрифугованого супернатанту бульйону, отриманого при ферментації *B. lentus*, внесеного в концентрації приблизно 30 MU/тонну в основні варіанти харчування). Група лікування 8 є контрольною без доданого ферменту. (1 MU = 4000 MO).

Партії основного корму у вигляді борошна ділять порівну на вісім частин і на кожну розприскують відповідну кількість тест-матеріалів. Корми для початкової стадії вирощування та стадії росту птаха містять 90 г/т Cobap (антикоксидальний лікарський препарат іонофорного типу) та 50 г/т BMD (антибіотик). Корми для завершальної стадії вирощування не містять лікарських препаратів.

Харчування для початкової стадії дають всім птахам у віці від одного до 21 дня, харчування для росту від 22 до 35 днів та харчування для завершальної стадії від 36 до 42 днів. Харчування та воду дають без обмеження. Харчування пропонують птахів у вигляді крихт/гранул протягом всіх періодів годівлі. Водопровідну воду використовують як питну та подають через внутрішню водопровідну систему.

Склад та аналізи базового експериментального харчування

Інгредієнти	Початкова стадія	Стадія росту	Завершальна стадія
Кукурудза	60,3851	67,6864	72,1098
Соєве борошно (48,5% CP)	34,5066	27,8363	23,3785
Жир, суміш AV	1,0516	0,9915	1,1389
Дикальційфосфат	1,761	1,2682	1,3021
Вапняне борошно	1,3192	1,383	1,26
Хлорид натрію	0,3299	0,3304	0,3305
L-lys,HCl	0,008	-	-
DL Метіонін	0,2135	0,0793	0,0552
Холін хлорид	0,05	0,05	0,05
Вітамінний премікс	0,25	0,25	0,25
Мінеральний премікс	0,075	0,075	0,075
Cobap, г/т	90	90	-
BMD, г/т	50	50	-
Розраховані аналізи ²			
MEп птаха (ккал/кг)	3080,0	3150,0	3200,0
Суша речовина, %	88,9169	88,9236	88,9054
Необроблений білок, %	22,0	19,3	17,5
Необроблене волокно, %	2,8813	2,8176	2,7632
Жир, %	3,6777	3,8291	4,0981
Кальцій, %	1,0	0,9	0,85
Загальний фосфор, %	0,7088	0,5967	0,5877
Доступний фосфор, %	0,45	0,35	0,35
Натрій, %	0,18	0,18	0,18

Лізин, %	1,2	1,0152	0,8948
Метіонін+Цистеїн, %	0,92	0,72	0,65
Треонін, %	0,8821	0,7657	0,6932
Триптофан, %	0,2938	0,2489	0,2185

По двох птахів з кожного з десяти загонів у групах лікування 3, 6 та 8 випадковим чином вибирають після зважування для аналізу крові через 42 дні, у цілому 20 птахів з 500/групу лікування. Зразки збирають на льоді в пробірки для збору крові, що містять агент гепарин проти згортання крові, та одержують плазму центрифугуванням.

Зразки плазми крові аналізують на курячий α -1-кислий глікопротеїн з використанням набору для аналізу на основі імунодифузії фірми Cardiotech Services, Inc. (Louisville, KY). Зразки сироватки, взяті у двох птахів/загін додають у тест-планшети (5 мкл/лунку) та в деякі лунки додають стандартний чистий AGP у концентрації, що доходить до мкг/мл. Преципітиніві кільця вимірюють, викорис-

товуючи шкалу для вимірювання преципітинових кілець для найближчого діаметру 0,1 мм.

Для побудови оптимальної кривої, що відповідає даним, і одержання можливості швидкого розрахунку концентрації AGP у зразках плазми використовують поліноміальне рівняння, як показано на Фігурі 1.

Вимірювання діаметрів преципітинових кілець для всіх виділених зразків курячої сироватки та розрахована концентрація AGP для кожного птаха показані в таблиці нижче. Птахи, які одержують мананазу, у середньому мають дуже статистично достовірне зниження середньої концентрації AGP у порівнянні з контрольними птахами.

День 42 Зразки крові (y = AGP мкг/мл, x = результат вимірювання кільця в мм)

Група лікування 3 (мананазу)		Група лікування 8 (контроль)		Група лікування 6 (мананазу)	
X	Y	X	Y	X	Y
5,3	225,0	6	317,7	5,3	225,0
5,3	225,0	6	317,7	5,7	276,2
4,9	178,6	6,1	332,1	5,8	289,7
5,2	212,9	5,2	212,9	5,1	201,2
5,8	289,7	7,4	546,9	5,4	237,4
5,4	237,4	5,4	237,4	5,7	276,2
5,4	237,4	6,2	346,9	5,5	250,0
5,9	303,6	5,9	303,6	6,1	332,1
5,6	262,9	6	317,7	5,4	237,4
5,9	303,6	6,2	346,9	5,2	212,9
5,2	212,9	6,1	332,1	5	189,7
5,4	237,4	5,6	262,9	6,1	332,1
5,3	225,0	5,9	303,6	5,5	250,0
5,1	201,2	6,3	361,9	5,5	250,0
5,3	225,0	6,2	346,9	6	317,7
5,3	225,0	7,5	565,5	5,4	237,4
5,7	276,2	7,4	546,9	5,6	262,9
5,3	225,0	7,5	565,5	4,4	127,2
5,7	276,2	7,5	565,5		
5	189,7	6,1	332,1		

	Група лікування 3 (мананазу)	Група лікування 8 (контроль)	Група лікування 6 (мананазу)
AVE	238,5	373,1	250,3
SD	35,8	115,6	51,3
CV	14,99	30,97	20,50
t-критерій р відносно 82,94E-05		t-критерій р відносно 8 0,000193	

Приклад 2

Проводять інший експеримент із використанням геміцелюлази (ендо-1,4- β -мананазу). У даному експерименті групи курей (10 загонів кожна, по 50 птахів/загін) годують одним із чотирьох варіантів харчування:

Група лікування 1 (контроль): Корм, що містить антибіотик BMD, покроплений після гранулювання контрольним складом, та 35% сорбітом з коричневим харчовим барвником, внесеним у кількості 100 мл/тонну корму.

Група лікування 2 (контроль): Корм без BMD, покроплений після гранулювання контрольним складом, та 35% сорбітом з коричневим харчовим барвником, внесеним у кількості 100 мл/тонну корму.

Група лікування 3: Корм, покроплений після гранулювання складом, що містить геміцелюлазу (ендо-1,4- β -мананазу), виділену з *B. lentus*, внесено у кількості 100 мл/тонну корму.

Група лікування 4: Корм, приготовлений з порошковою композицією (доданою в змішувач пе-

ред гранулюванням), що містить геміцелюлазу (ендо-1,4- β -мананазу), виділену з *B. lentus*, причому додають 454 г композиції/тонну корму, щоб одержати 100 MU/т корму. (1 MU = 4000 МО).

На початку експерименту використовують курчат у віці 1 день.

Харчування дають без обмежень. Корми для початкової стадії (дні 0-21), стадії росту (дні 21-35) і завершальної стадії (дні 35-42) з наступними складами використовують як базові корми:

Очікувані кількості

Аналіз живильних речовин	Початкова стадія	Стадія росту	Стадія завершення
МЕ* птаха, ккал	2960,0	3030,0	3080,0
Необроблений білок	22,0	19,4	17,5
Жир, %	3,1439	3,0647	3,4503
Кальцій, %	0,9	0,8	0,8
Загальний фосфат	0,7032	0,6315	0,515
Доступний фосфор	0,45	0,39	0,35
Натрій	0,18	0,18	0,18
Лізін, %	1,205	1,0302	0,9014
Метіонін	0,5446	0,3838	0,3435
Met+Cys	0,92	0,72	0,65

* Енергія метаболізму

Додані інгредієнти

Інгредієнт	Початкова стадія	Стадія росту	Стадія завершення
Вапно	0,8291	0,7674	0,9012
Сіль	0,2696	0,2698	0,2702
D-L метіонін	0,1963	0,0682	0,0532
Холін хлорид 70%	0,0500	0,0500	0,0500
Дикальційфосфат	1,6869	1,4088	1,2295
Жир	0,6517	0,4751	0,8162
Кукурудза	59,3480	67,4725	70,9038
Соеве борошно	33,5934	27,1132	22,4010
Борошно із пташиних субпродуктів	3,0	3,0	3,0
Вітаміни	0,25	0,25	0,25
Мінерали	0,075	0,075	0,075
Саліноміцин	0,05	0,05	0,05

У день 21 приблизно 3 мл крові збирають в 3 птахів/загін (30/групу). Кров поміщають у гепаринізовану пробірку та злегка перемішують. Пробірки повільно центрифугують та потім видаляють сироватку. Зразки сироватки поміщають у пробірки та позначають номерами загонів. Сироватку заморожують для наступного аналізу AGP, як описано вище в Прикладі 1. Кільця імунодифузії, що використовують для кількісної оцінки курячого α 1 кислого глікопротеїну, просто вимірюються, мають високу відтворюваність та показують коефіцієнт варіації 4% або менше.

Середні результати для дня 21 по 30 птахам/варіант лікування показані в таблиці нижче та графічно на Фігурі 2. Можна бачити, що вилучення антибіотику (BMD) з харчування приводить до сильного та істотного підвищення рівня AGP у плазмі (порівн. Групу лікування 1 та Групу лікування 2). Додавання будь-якого препарату геміцелюлази (ендо-1,4- β -мананазу) у харчування без BMD (Групи лікування 3 та 4) відновлюють AGP до рівня, що спостерігається при використанні антибіотику, вказуючи на істотне зниження імунологічного стресу.

Група лікування		1	2	3	4
AGP	Середній	214,35	267,99	220,28	233,09
	SD*	62,16	82,42	68,58	67,73
	CV**	29,00	30,76	31,13	29,06
Т-критерій	P		0,003055	0,008952	0,03919
	Відносно		Гр. лік. 1	Гр. лік. 2	Гр. лік. 3
Т-критерій	P				0,234892
	Відносно				Гр. лік. 3
Т-критерій	P			0,363305	0,134383
	Відносно			Гр. лік. 1	Гр. лік. 1

* Стандартне відхилення

** Коефіцієнт мінливості

Проводять також оцінку показників росту курей, результати якої підсумують у таблиці нижче.

Показники росту

День 21								
	FCR ¹	Знач. Р	Набір маси	Р вел.	Перетворення корму з поправкою на масу ²	Р вел.	CVID ³	Знач. Р
Гр. 1	1,394	0,150	0,693	0,016	1,379	0,017	13,81	0,33
Гр. 2	1,412		0,657		1,424		14,77	
Гр. 3	1,404	0,605	0,673	0,197	1,404	0,248	14,03	0,46
Гр. 4	1,407	0,740	0,670	0,459	1,410	0,551	14,40	0,69
День 42								
Гр. 1	1,776	0,006	2,102	0,189	1,772	0,007	11,23	0,19
Гр. 2	1,813		2,073		1,820		10,42	
Гр. 3	1,770	0,001	2,131	0,088	1,756	0,005	9,97	0,49
Гр. 4	1,761	0,0001	2,060	0,572	1,772	0,003	10,38	0,95

¹ - Перетворення корму

² - Перетворення корму з поправкою на масу тіла

³ - Коефіцієнт варіації в індивідуальних масах тіла

У такий спосіб як перетворення корму, так і перетворення корму з поправкою на масу тіла поліпшуються до дня 21 зі статистичною значимістю у курей, що одержують β-мананазу. Це показує, що зниження рівня сироваткового AGP може мати реальну значимість відносно показників тварини.

Приклад 3

Здатність інших ферментів, звичайно використовуваних у кормі для тварин, оцінюють у плані позитивної дії на AGP. Рациони для курей початкової стадії вирощування комерційного типу (з низькою енергією метаболізму) складають із кормовими продуктами, звичайно використовуваними в США. Дані раціони (у формі м'якої маси або гранул) дають без обмеження із часу прибуття курчати до дня 21 дослідження. Експериментальні лікувальні корми одержують із даного базового корму для початкової стадії вирощування. Лікувальні корми змішують, щоб забезпечити рівномірний розподіл відповідного тест-продукту.

Склад та аналізи базового експериментального харчування

Інгредієнти	
Кукурудза	59,398
Соєве борошно (48,5% CP)	33,5934
Жир, суміш AV	0,6517

Дикальційфосфат	1,6869
Валняне борошно	0,8291
Хлорид натрію	0,2696
DL Метіонін	0,1963
Борошно із пташиних субпродуктів	3,0
Холін хлорид 70%	0,05
Вітамінний премікс	0,25
Мінеральний премікс	0,075

Інгредієнти	
	LO ME*
ME _n птаха (ккал/кг)	2960
Необроблений білок, %	22,0
Необроблене волокно, %	2,8899
Жир, %	3,1439
Кальцій, %	0,9
Загальний фосфор, %	0,7032
Доступний фосфор, %	0,45
Натрій, %	0,18
Лізин, %	1,205
Метіонін+Цистеїн, %	0,92
Треонін, %	0,8266

* низька метаболічна енергія

BMD 50 г/т та саліноміцин 60 г/т додають в усі корми.

Ферментні препарати

Зразок	Фермент	Дані аналізу	Вихідний об'єм	Розріджувач	Зауваження	Рівень засто-сування
3	-	НВ*		20	+ харчовий барвник	20мл/100кг
6	Adessio, Rovabio Excel LC	Rovabio, комерційний продукт	10	10		20мл/100кг
7	Danisco, Avizyme (1500 гранульов.)	Avizyme, комерційний продукт	Твердий продукт	-		100 г/100 кг
8	PI-PLC	106 Од./мл	50	-		1,0 мл/кг
9	Genecor FRED Амілаза					20мл/100кг
10	Genecor Multifect XL					20мл/100кг
11	Dyadic Brewzyme BG					20мл/100кг
12	Hemicell	1092 MU/л	13	12		20мл/100кг
17	-	НВ		20	+ харчовий барвник	20 мл/100 кг

* - не визначають
(1 MU - 4000 MO)

Ферментні препарати. Додаткова інформація

Зразок	Основна активність	Рівень застосування	Міnorна активність ендо-1,3-β-глюканази*
3	-		
6	Ендо-1,4-β-ксилазаза 350 АХС Од./мл Ендо-1,4-β-глюканаза 500 АGL Од./мл	Ендо-1,4-β-ксилазаза 350 АХС 63350 АХС Ед./т Ендо-β-1,4-β-глюканаза 90500 АGL Од./т	9139 МО/т
7	Амілаза Ксилаза протеаза	1,0 кг/т	-
8	PI-PLC 106000 МО/л	96188 МО/т або 24 MU/т	
9	Амілаза 4700 MU/л	1,88x10 ⁶ МО/т або 470 MU/т	-
10	Ендо-1,4-β-ксилазаза 4500 MU/л	900000 МО/т або 225 MU/т	-
11	Ендо-1,4-β-1,3-глюканаза 1586 MU/л	634400 МО/т або 159MU/т	1040 МО/т
12	Ендо-1,4-β-мананаза 1092 MU/л	400000 МО/т або 100MU/т	580 МО/т
17			

ChemGen MU = 4000 MO; АХС - одиниці ксилазази за визначенням Adisseo;
AGL - одиниці глюканази за визначенням Adisseo; * - приблизний рівень, вимірюваний ChemGen Corp. за допомогою аналізу редукуючих цукрів.

Корм та вода доступні без обмеження протягом випробування. У день 15 птахів із груп лікування 17, 18, 19, 20 та 21 перорально інокують змішаним інокулюмом, що містить приблизно 30000 ооцист *E. Aseruvulina*/птаха, 2500 ооцист *E. Maxima*/птаха та 25000 ооцист *E. Tenella*/птаха.

Способи інокуляції ооцистами кокцидій описані в SPR SOP: IN1.002.

Визначають середні значення набирання маси тіла при клітинному вмісті, споживання корму та перетворення корму. Результати приводять нижче. Інфікують тільки тварин, що одержують зразок 17.

Зразок	Відн. групи лікування 3 t-тест P=	Лікування	Середн. AGP	Дані по росту на день 21 Середн. на- бир. живої маси	Перетворення	Рівень ферменту/метрич. тонну
3	-	контроль	170,52	0,624	1,438	Немає
6	0,2076	Rovabio	186,55	0,626	1,395	100 мл
7	0,2770	Avizyme	160,44	0,633	1,426	1,0 кг
8	0,1263	PI-PLC	196,35	0,650	1,406	106000 МО
9	0,3962	Амілаза	164,05	0,622	1,434	
10	0,3783	Ксиланаза	175,89	0,593	1,444	
11	0,2647	Глюканаза	182,00	0,629	1,396	
12	0,0178	Hemicell	138,22	0,645	1,421	102 MU
17	0,0043	Контроль інфіковані	252,04	0,564	1,507	Немає

Виявлено, що комерційні корми, що містять стандартні кількості амілази, 1,3-глюканази, 1,4-глюканази, ксиланази та PI-PLC, не знижують рівні AGP. У дійсності тільки геміцелюлаза (ендо-1,4-β-мананаза) показує істотний ефект на рівні AGP. Крім того, порівняння груп лікування 1 та 17 ясно показує, що AGP є високочутливим до APP у курей, оскільки інфекція підвищує рівень AGP до 82 мкг/мл. Див. також Фігуру 3.

Приклад 4

Корм для тварин, який тестують, що містить 1,3-β-глюкан, складають таким чином, щоб він включав 1,3-β-глюканазу в концентрації 400000 МО (100 ChemGen MU)/т корму. Корм для тварин, який тестують, вводять тест-курям, тоді як контрольні кури одержують той же корм для тварин (що містить 1,3-β-глюкан) без 1,3-β-глюканази. Через 21 та 42 дні ведення даної схеми оцінюють рівні сироваткового AGP у крові, як описано вище. Кури, що одержують корм для тварин, до складу якого входить фермент, мають істотно більш низькі рівні AGP ніж контрольні тварини. Крім того, тест-кури демонструють більш високу ефективність корму та підвищений набір маси в порівнянні з контрольними курми.

Приклад 5

Корм для тварин, який тестують, що містить джерело бактеріальної ДНК (наприклад Biolys ® Lysine або інший продукт ферментації, що містить клітинні продукти), складають таким чином, щоб він включав неспецифічну нуклеазу, виділену з *Cyanobacterium Anabaena* sp. 7120 (Nuc), одну з найбільш активних відомих неспецифічних нуклеаз (див. статтю Meiss, G. et al., Eur. J. Biochem. 251(3): 924-934, 1998). Фермент додають у концентрації 1×10^7 одиниць Кунітца ферменту/кг корму або приблизно 1 мг (на основі чистого ферменту) на кг корми. Корм для тварин, який тестують вводять тест-курям, тоді як контрольні кури одержують той же корм для тварин (що містить бактеріальну ДНК) без неспецифічної нуклеази. Через 21 день або 42 дні ведення даної схеми оцінюють рівні сироваткового AGP у крові, як описано вище. Кури, що одержують корм для тварин, до складу якого входить фермент, мають істотно більш низькі рівні AGP ніж контрольні тварини.

Приклад 6

Корм для тварин, який тестують, що містить м'ясо-кісткове борошно, кров'яне борошно або інший субпродукт тваринного походження, складають таким чином, щоб він включав фосфатидилсериндекарбоксилазу в концентрації 400000 МО/т корму. Корм для тварин, який тестують, вводять тест-курям, тоді як контрольні кури одержують той же корм для тварин без фосфатидилсериндекарбоксилази. Через 21 день або 42 дні ведення даної схеми оцінюють рівні сироваткового AGP у крові, як описано вище. Кури, що одержують корм для тварин, до складу якого входить фермент, мають істотно більш низькі рівні AGP ніж контрольні тварини.

Приклад 7

Корм для тварин, який тестують, що містить соєве борошно або борошно, отримане з іншої рослини, складають таким чином, щоб він включав ферменти β-мананази та/або 1,3-β-глюканази, виділені з *B. lentus*, кожний у концентрації 400000 МО/т корму. Корм для тварин, який тестують, вводять тест-курям, тоді як контрольні кури одержують той же корм для тварин без β-мананази або 1,3-β-глюканази. Через 21 день або 42 дні ведення даної схеми оцінюють рівні сироваткового AGP у крові, як описано вище. Кури, що одержують корм для тварин, до складу якого входить фермент, мають істотно більш низькі рівні AGP ніж контрольні тварини.

Приклад 8

У даному прикладі показано, що мананаза Hemicell®, додана в корм (традиційне кукурудзяно-соєве харчування), знижує рівень α1 кислого глікопротеїну (AGP) у сироватці індичок, при цьому поліпшуючи також показники росту. Експеримент складається з 48 загонів по 11 індичат (вихідне розміщення). Шість груп лікування повторюють в 8 блоках, рандомізованих у блоках із шести загонів кожний:

Кількість Птахів/Групу лікування	88
Число повторів/Групу лікування	8
Загальна кількість груп лікування	6
Загальна кількість загонів	48
Загальна кількість птахів	528

Одну групу лікування, що включає ферменти, що знижують стрес, відповідно до винаходу, Групу лікування 1 (комерційний Hemicell® у концентрації 100 MU/т корму), аналізують на AGP. (1 MU = 4000 MO) Група лікування 2 одержує контрольний корм без доданого ферменту.

Корм перемішують, щоб забезпечити рівномірний розподіл базових кормів серед груп лікування. Всі ферменти перемішують (розбризкують), щоб забезпечити рівномірний розподіл тест-ферментів і забезпечити близькі умови харчування в групах лікування. Щоразу, коли готують лікувальний корм, зразок з верхньої частини, середини та нижньої частини кожної партії лікувального корму змішують для одержання змішаного зразку. Один зразок беруть із кожного змішаного зразка для кожного варіанту лікування та для перевірки рівня ферменту.

Харчування для індичок, яким годують у даному дослідженні групи лікування 1 та 2, детально

описано нижче в наступних таблицях. У Таблицях показують склади компонентів, розраховані рівні живильних речовин та, нарешті, деякі вимірювані значення живильних речовин з урахуванням повернення кормів. Харчування є репрезентативним у тому плані, що його можна було б використовувати при комерційному вирощуванні індичок та, внаслідок цього, харчування кілька разів підбирають протягом 20-тижневого періоду. Композиції харчування змінюють на тижні 6, 9, 12, 15 та 18.

Композиції харчування для кожного періоду небагато розрізняються для груп лікування 1 та 2. Добре відомо, що мананаз Hemicell® має ефект підвищувати ефективний енергетичний вміст кормів (див. патент США 6162473). По даній причині харчування Групи лікування 1 складено з меншим вмістом калорій ніж харчування для Групи лікування 2, щоб звести до мінімуму різницю в рості між групами лікування 1 та 2 з метою даного дослідження.

Композиція інгредієнтів та розраховані рівні живильних речовин, 0-9 тижнів

Період Інгредієнт, %	0-6 тижнів		6-9 тижнів	
	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2
Кукурудза	46,77	45,39	53,14	51,79
Соеве борошно	37,15	37,40	29,30	29,50
Борошно із птаха	9,00	9,00	9,00	9,00
Пташиний жир	1,50	2,65	3,50	4,65
Вапно	1,20	1,20	1,25	1,25
Дикальційфосфат 18,5	2,70	2,70	2,35	2,35
Сіль	0,325	0,325	0,315	0,32
DL Метіонін	0,315	0,315	0,245	0,25
L-Лізин-HCl	0,41	0,405	0,335	0,34
Премікс вітамінів	0,25	0,25	0,25	0,25
Мікроелементи	0,075	0,075	0,075	0,075
Холін Cl 60%	0,135	0,135	0,085	0,085
Сульфат міді	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 г/фунт (130 г/кг)	0,055	0,055	0,05	0,05
BMD 50 г/фунт (110 г/кг)	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Необроблений білок (%)	28,00	28,00	24,5	24,5
МО (Ккал/фунт)	1323	1323	1408	1407
Кальцій (%)	1,484	1,484	1,462	1,462
Доступний фосфор (%)	0,797	0,797	0,764	0,763
Лізин (%)	1,794	1,793	1,502	1,501
Met+Cys (%)	1,179	1,177	1,018	1,021

Композиція інгредієнтів та розраховані рівні живильних речовин, 9-15 тижнів

Період	9-12 тижнів		12-15 тижнів	
Інгредієнт, %	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2
Кукурудза	56,88	55,55	62,45	61,05
Соеве борошно	24,55	24,75	21,15	21,40
Борошно із птаха	9,00	9,00	7,00	7,00
Пташиний жир	5,00	6,22	5,00	6,15
Вапно	1,20	1,20	1,15	1,15
Дикальційфосфат 18,5	1,95	1,95	1,75	1,75
Сіль	0,32	0,32	0,32	0,32
DL Метіонін	0,22	0,22	0,30	0,30
L-Лізин-HCl	0,315	0,315	0,42	0,42
Премікс вітамінів	0,25	0,25	0,25	0,25
Мікроелементи	0,075	0,075	0,075	0,075
Холін Cl 60%	0,085	0,085	0,015	0,015
Сульфат міді	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 г/фунт (130 г/кг)	0,05	0,05	0,00	0,00
BMD 50 г/фунт (110 г/кг)	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Необроблений білок (%)	22,5	22,5	20,0	20,0
МО (Ккал/фунт)	1469	1469	1490	1490
Кальцій (%)	1,35	1,35	1Д9	1,19
Доступний фосфор (%)	0,681	0,681	0,59	0,59
Лізин (%)	1,350	1,350	1,298	1,298
Met+Cys (%)	0,940	0,940	0,95	0,95

Композиція інгредієнтів та розраховані рівні живильних речовин, 15-20 тижнів

Період	15-18 тижнів		18-20 тижнів	
Інгредієнт, %	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2	Група лікування 1 з Hemicell®	Група лікування 2
Кукурудза	67,25	65,85	70,60	69,15
Соеве борошно	17,90	18,15	15,60	15,85
Борошно із птаха	5,00	5,00	4,00	4,00
Пташиний жир	6,00	7,15	6,50	7,70
Вапно	1,00	1,00	0,85	0,85
Дикальційфосфат 18,5	1,50	1,50	1,23	1,23
Сіль	0,33	0,33	0,34	0,34
DL Метіонін	0,205	0,205	0,193	0,193
L-Лізин-HCl	0,340	0,340	0,235	0,235
Премікс вітамінів	0,25	0,25	0,25	0,25
Мікроелементи	0,075	0,075	0,075	0,075
Холін Cl 60%	0,02	0,02	0,02	0,02
Сульфат міді	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 г/фунт (130 г/кг)	0,00	0,00	0,00	0,00
BMD 50 г/фунт (110 г/кг)	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Необроблений білок (%)	17,5	17,5	16,0	16,0
МО (Ккал/фунт)	1539	1539	1570	1570
Кальцій (%)	0,982	0,982	0,82	0,82
Доступний фосфор(%)	0,490	0,490	0,41	0,41
Лізин (%)	1,10	1,10	0,93	0,93
Met+Cys (%)	0,791	0,791	0,74	0,74

Аналіз харчування з поверненням кормів, 0-12 тижнів

Живильна речовина	Група лікування 1 з Hemicell®		Група лікування 2	
	Розраховане	Отримане при аналізі	Розраховане	Отримане при аналізі
0-3 тижня				
Білок	28	27,46	28	27,57
Жир	4,2	4,03	5,3	4,99
Кальцій	1,48	1,38	1,48	1,45
Загальний фосфор	1,02	0,96	1,02	1,08
Hemicell одиниць	100	70,1	0	8,9
3-6 тижнів				
Білок	28	25,90	28	27,17
Жир	4,2	4,01	5,3	5,16
Кальцій	1,48	1,63	1,48	1,52
Загальний фосфор	1,02	1,15	1,02	1,12
Hemicell одиниць	100	99,3	0	8,9
6-9 тижнів				
Білок	24,5	23,42	24,5	24,17
Жир	6,3	6,33	7,4	7,00
Кальцій	1,46	1,69	1,46	1,65
Загальний фосфор	0,96	1,09	0,96	1,06
Hemicell одиниць	100	138,6	0	14,4
9-12 тижнів				
Білок	22,5	22,61	22,5	23,61
Жир	7,9/8,0	7,91	9,0	9,02
Кальцій	1,35	1,37	1,35	1,32
Загальний фосфор	0,86	0,93	0,86	0,90
Hemicell одиниць	100	83,9	0	12,0

Аналіз харчування з поверненням кормів, 12-80 тижнів

Живильна речовина	Група лікування 1 з Hemicell®		Група лікування 2	
	Розраховане	Отримане при аналізі	Розраховане	Отримане при аналізі
12-15 тижнів				
Білок	20	20,49	20	21,09
Жир	7,79	8,25	8,89	9,03
Кальцій	1,19	1,16	1,19	1,09
Загальний фосфор	0,76	0,78	0	0,77
Hemicell одиниць	100	90,5	0	13,6
15-18 тижнів				
Білок	17,5	17,20	17,5	16,24
Жир	8,68	8,00	9,78	9,21
Кальцій	0,98	0,96	0,98	0,94
Загальний фосфор	0,65	0,68	0,65	0,70
Hemicell одиниць	100	98,6	0	5,6
18-20 тижнів				
Білок	16,0	15,95	16,0	15,14
Жир	9,14	8,93	19,29	10,39
Кальцій	0,82	0,79	0,82	0,87
Загальний фосфор	0,57	0,61	0,57	0,65
Hemicell одиниць	100	113,4	0	13,6

Вимірювання глікопротеїну:

Кров одержують наприкінці випробування від чотирьох птахів/загін, вибраних випадковим чином із груп лікування 1, 2 та 5. Кров збирають у пробірки, що містять агент проти згортання ЕДТА (етилендіамінтетраоцтову кислоту), змішують, потім центрифугують для осадження цілих клітин.

Планшети для тестування AGP індичок одержують в Cardiotech Services (Louisville, KY). Тест

на AGP являє собою тест на основі імунодифузії. Рівні об'єми тест-зразків або зразків сироватки додають у лунки планшета для імунодифузії, як рекомендує виробник, потім через два дні інкубування при кімнатній температурі вимірюють діаметр отриманих у результаті кілець імунопреципітації.

Зразок стандарту очищеного AGP індички, що представлений в наборі, тестують у різних

концентраціях, щоб накреслити стандартну криву, як показано на Фігурі 4. Поліноміальне рівняння підбору кривої, отримане зі стандартом,

використовують для розрахунку рівня AGP у плазмі індичок у тест-зразках.

Розрахунок рівнів AGP та статистичний аналіз із використанням t-критерію Ст'юдента

Hemicell мананаза (Група лікування 1)			Контроль (Група лікування 2)		
мм	AGP	Викиди	мм	AGP	викиди
5,2	231,5		5,7	304,5	
4,8	181,6		5,1	218,4	
5	205,7		5,6	288,9	
5	205,7		5,3	245,1	
5	205,7		5,1	218,4	
5,1	218,4		5,1	218,4	
5,3	245,1		5,9	337,3	
6,1	372,3		5	205,7	
5,8	320,6		6,3	409,6	
4,7	170,2		7,5		687,1
4,9	193,4		6,45	439,1	
5	205,7		5,4	259,2	
5,2	231,5		5,1	218,4	
5,5	273,8		5,3	245,1	
5,7	304,5		5,1	218,4	
5,1	218,4		5,6	288,9	
4,7	170,2		5,6	288,9	
5	205,7		6,05	363,3	
4,5	148,5		5,6	288,9	
5,3	245,1		5,4	259,2	
5,2	231,5		5	205,7	
4,4	138,3		5	205,7	
4,3	128,4		5,2	231,5	
6,35	419,3		5,4	231,5	
4,9	193,4		4,8	181,6	
5,65	296,6		5	205,7	
5,2	231,5		5,2	231,5	
5	205,7		5,4	259,2	
4,8	181,6		4,9	193,4	
5,2	231,5		5,1	218,4	
7,5		687,1	4,2	118,9	
5	205,7		6,5	449,3	
Середнє		226,4			260,5
Станд. відхилення		63,4			74,6
CV		28,0			28,6
t-критерій, значення P					0,0284

Викиди >2 ст. відхилень від середнього відкидають

Середнє AGP плазми для групи, що лікували ферментом, істотно менше, ніж для контрольної групи, яку не лікували. Для даного аналізу один викид видаляють із аналізу з кожної групи. Можна виявити птахів, які зазнають незвичайну кількість стресу внаслідок ушкодження або інфекції. Зни-

жений рівень AGP, що викликається годівлею ферментом, корелює зі статистично значимими поліпшеними життєвими показниками птахів, як показано нижче в Групі лікування 1 (мананаза) відносно Групи лікування 2.

Результати росту День 140

Hemicell							
Загін	Маса	Смертність, кількість	Маса при загибелі	Споживання корму	Перетворення корму	Набирання живої маси	CV при масі на 140 день
3	200,25	0	0	487,35	2,434	18,147	5,766
7	193,3	0	0	479,55	2,481	17,512	7,426
14	143,95	3	10,817	389,05	2,514	17,934	6,857
21	164,1	2	24,205	448,70	2,383	18,172	4,411
29	185,8	1	0,975	448,90	2,403	18,521	6,092
36	161,1	2	16,49	419,90	2,364	17,839	8,352
37	182,1	1	7,611	443,70	2,339	18,150	5,944
47	182,55	1	13,115	449,05	2,295	18,195	3,405
Середнє				445,78	2,402	18,059	6,032
	t-критерій, від. Групи лік. 2	значення Р			0,05	0,01	0,05
Контроль							
5	144,1	2	13,085	389,00	2,475	15,950	14,518
12	196,1	0	0	486,70	2,482	17,766	5,288
13	178,7	1	14,65	466,25	2,411	17,810	9,717
23	141,95	3	21,912	389,40	2,376	17,684	8,012
28	190,2	0	0	482,10	2,535	17,231	9,331
35	194,5	0	0	486,25	2,500	17,622	9,722
42	159,25	2	10,814	409,40	2,407	17,635	5,054
48	176,65	1	9,05	459,10	2,472	17,605	4,772
Середнє				446,03	2,457	17,413	8,302

Птахи, що одержують корм із мананазою, мають більше середнє набирання маси на 3,7%, знижений рівень перетворення корму на 2,3% та зменшення CV (коефіцієнта варіації = відхилення по Ст'юденту/середнє значення) однаковості маси тіла. Зниження імунного стресу, як показано за допомогою знижених сироваткових рівнів AGP, корелює з деякими вимірюваннями поліпшення росту.

Приклад 9

У даному прикладі 1,4- β -мананазу з *B. lentus*, 1,3- β -глюканазу з *B. lentus* та комбінацію даних двох ферментів додають у корм (прийняте кукурудзяно-соеве харчування). Кожен варіант лікування ферментом поліпшує показники росту живого птаха у 700 6-тижневих самок індички породи Nicholas, причому результати, досягнуті за допомогою комбінації неочікувано перевищують результати, досягнуті при лікуванні тільки одним з ферментів.

В експерименті використовують 80 загонів по 40 самок індички. Лікування повторюють у десятих (10) блоках з використанням восьми варіантів лікування (сім варіантів лікування ферментами та один негативний контроль), рандомізованих у кожному блоці.

У групі лікування 3 використовують композицію, що містить фермент, що знижує імунний стрес, відповідно до винаходу, 1,4- β -мананазу в концентрації 100 MU/т корму. У групі лікування 6 також використовують композицію, що містить

фермент, що знижує імунний стрес, відповідно до винаходу, 1,3- β -глюканазу в концентрації 60 MU/т корму. У групі лікування 8 використовують комбіновану композицію, що відповідає винаходу, що включає 1,4- β -мананазу в концентрації 100 MU/т корму та 1,3- β -глюканазу в концентрації 60 MU/т корму. Група лікування 1 одержує контрольне харчування без доданого ферменту. (1 MU = 4000 MO).

Корм перемішують, щоб забезпечити рівномірний розподіл базових кормів серед груп лікування. Всі ферменти перемішують (розприскують), щоб забезпечити рівномірний розподіл тест-ферментів та забезпечити близькі умови харчування в групах лікування. Щоразу, коли готують лікувальний корм, зразок з верхньої частини, середини та нижньої частини кожної партії лікувального корму змішують для одержання змішаного зразку. Один зразок беруть із кожного змішаного зразка для кожного варіанту лікування та для перевірки рівня ферменту.

Харчування для індичок, яким годують у даному дослідженні, являє собою типові комерційні корми для індичок. Харчування є репрезентативним у тому плані, що його можна було б використовувати при комерційному вирощуванні індичок та, внаслідок цього, харчування коректують через 3 тижні. Результати росту для груп лікування 1, 3, 6 та 8 показані в таблиці нижче.

Варіант лікування		Параметри росту на 6 тижнів			
		Смертність (%)	Середня жива маса (фунти)	Перетворення корму ¹	Маса з поправкою на перетворення корму ²
Гр. 1	Контроль	1,75 ^A	5,406 ^A	1,500 ^A	1,520 ^A
Гр. 3	1,4-β-мананаза (100 MU/т)	1,50 ^A	5,484 ^{ABC}	1,495 ^{AB}	1,502 ^{AB}
Гр. 6	U-β-глюканаза (60 MU/т)	1,50 ^A	5,540 ^C	1,467 ^C	1,465 ^C
Гр. 8	1,4-β-мананаза (100 MU/т) 1,3-β-глюканаза (60 MU/т)	3,25 ^A	5,718 ^D	1,420 ^D	1,389 ^D

(1 MU = 4000 MO)

Зауваження 1: Перетворення корму дане з поправкою на смертність.

Зауваження 2: Масу з поправкою на перетворення корму для кожного варіанту лікування розраховують у такий спосіб: (а) Середню живу масу всього тесту віднімають із середньої живої маси, призначеної для лікування, одержуючи кількість Quantity A; (b) кількість A ділять на 6, одержуючи в результаті кількість B; (c) кількість B віднімають із перетворення корму, що дає в результаті масу з поправкою на перетворення корму, призначену для лікування. Статистичні дані представлені для LSD-тесту; P<0,05.

У порівнянні із Групою лікування 1 (контроль) самки індички, що одержують Лікування групи 3 (корм із 1,4-β-мананазою), мають у кількісному відношенні підвищену середню живу масу та у кількісному відношенні поліпшене (знижене) перетворення корму. Аналогічно самки індички, що одержують Лікування групи 6 (корм із 1,3-β-глюканазою) мають статистично достовірну підвищену середню живу масу та статистично достовірне поліпшене (знижене) перетворення корму.

Неочікувано, що самки індички, що одержують Лікування групи 8 (корм із комбінацією 1,4-β-мананази та 1,3-β-глюканази) мають незвичайно більшу статистично достовірну підвищену середню живу масу та незвичайно велике статистично достовірне поліпшене (знижене) перетворення корму. Результати, що спостерігаються в Групі лікування 8, перевищують результати, які можна було б пояснити адитивним ефектом двох ферментів, введених окремо. Таким чином, комбіноване лікування, що включає 1,4-β-мананазу та 1,3-β-глюканазу, дає неочікувано велике поліпшення показників росту.

Приклад 10

У даному прикладі 1,3-β-глюканазу з *B. lentus*, ксилотглюканазу з *B. lentus* та комбінацію даних двох ферментів додають у корм (прийняту кукурудзяно-соеву їжу). Лікування кожним з ферментів поліпшує показники росту живого птаха в самців бройлерних курей у віці 35 днів, причому результати, досягнуті при використанні комбінації вище, ніж результати, досягнуті при варіантах

лікування з використанням тільки одного з ферментів.

В експерименті використовують 49 загонів по 44 самця курей Cobb x Cobb. Варіанти лікування повторюють у сімох блоках при сімох варіантах лікування (шість варіантів лікування ферментами та один негативний контроль), рандомізованих у кожному блоці.

У групі лікування 4 використовують композицію, що містить фермент, що знижує імунний стрес, що відповідає винаходу, 1,3-β-глюканазу, у концентрації 70 MU/т корму. У групі лікування 5 також використовують композицію, що містить фермент, що знижує імунний стрес, що відповідає винаходу, ксилотглюканазу, у концентрації 100 MU/т корму. У групі лікування 6 використовують комбіновану композицію, що відповідає винаходу, що містить ксилотглюканазу в концентрації 100 MU/т корму та 1,3-β-глюканазу в концентрації 60 MU/т корму. Група лікування 1 є контрольною з кормом без доданого ферменту. (1 MU = 4000 MO).

Корм перемішують, щоб забезпечити рівномірний розподіл базових кормів серед груп лікування. Всі ферменти перемішують (розбризкують), щоб забезпечити рівномірний розподіл тест-ферментів та забезпечити близькі умови харчування в групах лікування. Щоразу, коли готують лікувальний корм, зразок з верхньої частини, середини та нижньої частини кожної партії лікувального корму змішують для одержання змішаного зразку. Один зразок беруть із кожного змішаного зразку для кожного варіанту лікування та для перевірки рівня ферменту.

Харчування, яким годують у даному дослідженні, являє собою типові корми для бройлерних курей. Харчування є репрезентативним у тому плані, що його можна було б використовувати при комерційному вирощуванні бройлерів та, внаслідок цього, харчування коректують через 3 тижні. Результати росту для груп лікування 1, 4, 5 та 6 через 35 днів вирощування показані в таблиці нижче:

Варіант лікування		Параметри росту на 35 днів			
		Смертність (%)	Середня жива маса (фунти)	Перетворення корму ¹	Маса з поправкою на перетворення корму
Гр.1	Контроль	3,25 ^A	4,347 ^A	1,675 ^A	1,690 ^A
Гр. Т4	1,3-β-глюканаза (70 MU/т)	3,25 ^A	4,433 ^{AB}	1,651 ^{AB}	1,651 ^{AB}
Гр. 5	Ксилотглюканаза (100 MU/т)	2,92 ^A	4,415 ^{AB}	1,646 ^{AB}	1,650 ^{AB}
Гр. 6	Ксилотглюканаза (100 MU/т) та 1,3-β-глюканаза(70 MU/т)	4,55 ^A	4,461 ^{AB}	1,643 ^{AB}	1,639 ^{AB}

(1 MU = 4000 MO)

Зауваження 1: Перетворення корму дане з поправкою на смертність.

Зауваження 2: Масу з поправкою на перетворення корму для кожного варіанту лікування розраховують, як описано вище. Статистичні дані представлені для LSD-тесту; P<0,05.

У порівнянні із Групою лікування 1 (контроль) курчата, що одержують Лікування групи 4 (1,3-β-глюканаза) мають у кількісному відношенні підвищену середню живу масу та у кількісному відношенні поліпшене (знижене) перетворення корму. Аналогічно курчата, що одержують Лікування групи 5 (корм із ксилотглюканазою) мають у кількісному відношенні підвищену середню живу масу та у кількісному відношенні поліпшене (знижене) перетворення корму.

Курчата, що одержують Лікування групи 6 (комбінацію 1,3-β-глюканази та ксилотглюканази) досягають поліпшення у середній живій масі та перетвореннях корму, що перевищує ефект, що спостерігається, коли ферменти вводять окремо. Таким чином, комбіноване лікування, що включає 1,3-β-глюканазу та ксилотглюканазу, досягає істотного поліпшення в показниках росту.

Приклад 11

Зниження рівня сироваткового APP у курей при введенні в корм ферментів

Бройлерних курей вирощують протягом 1-14 днів та годують типовим кукурудзяно-соевим харчуванням для початкової стадії росту (як показано нижче в таблиці Склад харчування) з різними доданими ферментами (як підсумовано нижче в таблиці Ферменти). Розміри зразку для кожного ферменту, включають три клітки з вісьма птахами/клітку.

Склад харчування

Компонент	Відсоток
Кукурудза 7,35% CP	53,98
Соеве борошно 47,2 CP	39,03
Соеве масло	3,0
Вапно	1,307
Дикальційфосфат	1,735
Сіль (NaCl)	0,331
DL-метіонін	0,186
Вітамінний премікс	0,25
Холін хлорид 60%	0,05
Сульфат міді	0,05

Ферменти

Варіант лікування	Фермент 1	Фермент 2	Фермент 3	мг/л AGP	Знач. Р t-критерій
A	-	-	-	268,1	
B	1,3-β-галактаназа (46,495 MO/т)	1,4-β-мананаза (85,312 MO/т)	-	281,4	
C	1,3-β-галактаназа (9,8911 MO/т)	1,4-β-мананаза (181,488 MO/т)	-	266,6	
D	1,4-β-галактаназа (81,046 MO/т)	1,4-β-мананаза (174,889 MO/т)	-	261,7	
E	1,4-β-галактаназа (114,418 MO/т)	1,4-β-мананаза (246,902 MO/т)	-	261,7	
F	Ксиланаза (95,225 MO/т)	1,4-β-мананаза (381,142 MO/т)	-	257,8	
G	Хитиназа (5,218 MO/т)	1,4-β-мананаза (27,016 MO/т)	-	263,8	
H	Хитиназа (5,218 MO/т)	1,4-β-мананаза (205,807 MO/т)	-	220,2	0,040
I	1,3-β-глюканаза (127,042 MO/т)	1,4-β-мананаза (181,488 MO/т)	-	236,9	0,125
J	Ксиланаза (126,758 MO/т)	1,4-β-мананаза (362,976 MO/т)	Естераза	234,5	0,083

"Естераза" у Групі лікування J являє собою неохарактеризований фермент із гену B. lentus,

що перебуває в тому самому опероні із ксиланазою. Субстрат для даного ферменту не ідентифі-

кований. Його визначення як "естерази" основане на близькості послідовності ДНК даного гену до інших відомих генів естерази. Активність естерази не визначена, але була б близька до рівня ксиланази, якби два білки мали близькі специфічні активності.

1,4- β -галактаназу та 1,3-галактаназу вимірюють, використовуючи аналіз редукуючих цукрів з пектиновим субстратом.

На день 14 у всіх птахів збирають сироватку крові та аналізують зразки на вміст α -кислого глікопротеїну (AGP), як описано вище. Середній рівень α -кислого глікопротеїну з кожної групи лікування показаний у таблиці вище.

Як показано в таблиці, щодо групи лікування А (без ферменту) групи лікування Н, І та J дають у результаті зниження рівня сироваткового AGP.

Група лікування Н (хітиназа та 1,4- β -мананаза) дає істотні результати тільки через два тижні росту. Хоча кількості ферментів знаходяться на рівнях, які не дають відповідь в інших групах лікування (порівн. із Групою лікування G з порівнянню кількістю хітинази та групами лікування Е та F з порівнянними кількостями 1,4- β -мананази), комбінація хітинази та 1,4- β -мананази дає в результаті істотне зниження рівня AGP, яке не можна було б прогнозувати за результатами, отриманим при використанні тільки одного ферменту.

Група лікування І (1,3- β -глюканаза та 1,4- β -мананаза) дає помітні результати, хоча не явно статистично значимі в даному експерименті (значення Р 0,125). В інших тестах більшої тривалості лікування 1,3- β -глюканазою та 1,4- β -мананазою все-таки має істотну дію на рівень AGP.

Порівняння Групи лікування J (ксиланаза, 1,4- β -мананаза, естраза; Р=0,083 відносно контрольної Групи лікування А) із Групою лікування F (ксиланаза + 1,4- β -мананаза без "естерази") показує, що Група лікування J дає помітний ефект, причому Група лікування F не показує зниження рівня AGP.

Приклад 12

У даному прикладі аналізують припущення про те, що зміна складу корму шляхом включення інгредієнтів, які стимулюють вроджену імунну систему, буде підвищувати рівні сироваткового АРР.

Тест із бройлерними курми у віці 21 дня проводять, використовуючи базове кукурудзяно-соеве харчування з високоенергетичним харчуванням із соєвим маслом як контроль. Для одержання тест-харчування контрольне харчування модифікують таким чином, щоб воно містило використовувані на практиці матеріали, що приблизно включають імуностимулюючі компоненти, при підтримці такої ж приблизно еквівалентної живильної цінності. Тест-харчування включає наступні варіанти:

Кукурудза/соя/соеве масло контроль

Включення суміші масел АВ (суміш тваринних та рослинних масел);

Включення соєвого лецитину;

Включення борошна із птаха;

Включення DDGS (гранули барди та розчинні побічні продукти, одержувані при виробництві етанолу) у концентрації 5% із соєвим лушпинням;

Включення DDGS у концентрації 15% мас. без соєвого лушпиння.

Харчування описане більш детально в нижчеподаних таблицях.

Суміш АВ та соєвий лецитин, як очікують, містять фосфоліпіди, що включають стимулятор вродженої імунної системи фосфатидилсерін. Борошно із птаха може містити фосфатидилсерін, гіалуронан та різні мікробні стимулятори, виділені з побічних продуктів виробництва або вторинний мікробний ріст, що може мати місце перед обробкою. Очікують, що DDGS містить у великій кількості залишки дріжджів, включаючи клітинні стінки, що містять α -манан, 1,3- β -глюкан та хітин, а також потенційно стимулюючі вуглеводні полімери, що не ферментуються, з вихідного ферментаційного субстрату.

Склади харчування

Компонент	Склад, %					
	Харчування № 1	Харчування № 2	Харчування № 3	Харчування № 4	Харчування № 5	Харчування № 6
Кукурудза 7,35% СР	56,9707	56,2985	56,2985	59,878	47,7939	49,3523
Соеве борошно 48,5% СР	36,4392	36,5403	36,5403	29,048	29,0293	29,0284
Соеве масло	2,5279	0	0	1,7221	3,1922	2,6831
Суміш АВ ^c	0	3,0975	0	0	0	0
Соевий лецитин	0	0	3,0975	0	0	0
ВРМ птах 65%	0	0	0	5,0	0	0
Соеве лушпиння ^d	0	0	0	1,0559	1,0586	0
DDGS ^b	0	0	0	0	15	15
Вапно	1,3129	1,3118	1,3118	1,2224	1,4158	1,4293
Дикальційфосфат	1,7527	1,7544	1,7544	1,766	1,5615	1,5576
Сіль	0,3312	0,3315	0,3315	0,2313	0,1416	0,1407
DL-метіонін	0,2404	0,241	0,241	0,2276	0,2419	0,2392
L-лізин HCl	0	0	0	0,0131	0,1402	0,1402
Вітамінний премікс 0,25%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Мінеральний премікс 0,075%	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Холін хлорид 60%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Сульфат міді	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

^a BPM птахів (борошно із субпродуктів); ^b DDGC (сухі гранули барди та розчинні речовини); ^c суміш AV (суміш тваринних та рослинних масел); ^d додавання соєвого лушпиння до харчування з борошном із птаха коректує вміст манану, щоб компенсувати знижений вміст соєвого борошна.

Для кожного варіанта харчування бройлерних курей (Cobb x Cobb) вирощують у трьох батареях клітин Петерсима з вісьма птахами/клітку (0,631 кв. фут (590 см²)/птаха. Через 21 день аналізують сироваткові рівні AGP кожного птаха, як описано в попередніх прикладах.

Модифіковані варіанти харчування дають ясний доказ того, що вроджена імунна система ос-

нована на істотному підвищенні рівнів сироваткового AGP на 21 день, як показано в наступній таблиці. Дані також акцентують увагу на можливостях знизити імунний стрес, що викликається компонентами харчування, що відповідають винаходу, наприклад, шляхом використання композицій, що включають ферменти, які розкладають інгредієнти, що викликають імунний стрес.

Харчування	Добавка	AGP, мг/л	t-критерій (значення Р відн.1)
1	Контроль	221,9	
2	Суміш AV	301,2	0,01882
3	Лецитин	309,0	0,01052
4	Борошно із птаха	265,8	0,08613
5	DDGC з лушпинням	307,6	0,00002
6	DDGC	386,7	0,00275

Приклад 13

Даний приклад демонструє ефективність композицій, що включають 1,3-β-глюканазу, у зниженні імунного стресу, пов'язаного з 1,3-β-глюканом, що є присутнім у кормах, та, за допомогою його зв'язку із клітинними стінками грибів, являє собою молекулярну структуру, приблизно універсально розпізнавану вродженою імунною системою тварин. Результати показують, що, подібно 1,4-β-мананазі, 1,3-β-глюканазу знижує сироваткові рівні APP та поліпшує показники росту тварини.

Бройлерних курей (Cobb x Cobb) вирощують із дня 1 до 21 на типовому харчуванні з кукурудзяно-соєвого борошна з низьким вмістом жиру, наведеним у таблиці нижче. У двох випадках у харчування вводять добавки шляхом однорідного розбризкування розчинів рідких концентратів ферментів, отриманих з ферментацій *B. lentus*, щоб внести або 400000 МО/т 1,4-β-мананазу або 264000 МО/т 1,3-β-глюканазу. (У цьому випадку тонна являє собою 2000 фунтів або 907,4 кг).

Склад харчування

Компонент	Харчування, %
Кукурудза 7,35% CP	59,5757
Соєве борошно 48,5% CP	36,0474
Соєве масло	0,321

Група лікування	AGP мг/л	t-критерій відн. контролю	WAFС	Значення Р
Контроль (без ферменту)	255,4	-	1,47	a
1,4-β-мананазу	184,1	0,011	1,39	ab
1,3-β-глюканазу	157,7	0,001	1,26	c

Як 1,4-β-мананазу, так і 1,3-β-глюканазу знижують сироваткові рівні α1-кислого глікопротеїну

Вално	1,3175
Дикальційфосфат	1,7461
Сіль	0,3294
DL-метіонін	0,2378
Вітамінний премікс 0,25%	0,25
Мінеральний премікс 0,075%	0,075
Холін хлорид 60%	0,05
Сульфат міді	0,05

Для кожного типу харчування птахів вирощують у трьох батареях кліток Петерсима з вісьма птахами/клітку (0,631 кв. фут (590 см²)/птаха. Через 21 день аналізують сироваткові рівні AGP кожного птаха, як описано в попередніх прикладах. Маса тіла птахів та спожитого корму визначають, використовуючи стандартні способи та розраховують перетворення корму. Результати показують у наступній таблиці.

WAFС (перетворення корму з поправкою на масу) розраховують у такий спосіб

$$WAFС = FC - 2,204 * ((W - W_a) / 3),$$

де

FC = маса спожитого корму/набрану масу

W_a = середня маса всіх птахів у випробуванні

W = середній набір живої маси/клітку

(AGP). Лікування обома ферментами знижує рівень перетворення корму з поправкою на масу та

зниження в групі, що годують 1,3-β-глюканазою, статистично вірогідно.

Приклад 14

Випробування із бройлерними курми проводять у батареї кліток Петересина з використанням корму та способів, описаних вище в Прикладі за винятком лікування іншими ферментами, як підсумують у таблиці нижче.

Група лікування	Фермент(и)	Доза (МУ/т)	AGP (мг/л)
1	1,3-β-глюканаза	0	215,5
2	1,3-β-глюканаза	3	213,7
3	1,3-β-глюканаза	15	199,4
4	1,3-β-глюканаза	30	185,5
5	1,3-β-глюканаза	60	201,0
6	1,3-β-глюканаза 1,4-β-мананаза	60 100	189,2
7	1,3-3-глюканаза	75	194,9
8	1,3-β-глюканаза	90	180,7
9	Літиказа	60	165,2
10	Ксилоглюканаза	100	162,2

(1 MU = 4000 MO)

Підвищені рівні 1,3-β-глюканази приводять у результаті до підвищеного ефекту на рівень AGP (наприклад, доза-відповідь) до приблизно 30 MU/t (120000 MO/t). Представляючи даний тип корму для тварин із приблизно 30 MU/t (120000 MO/t) 1,3-β-глюканази, очікують, що він знизить імунний стрес, що відображається в зниженому рівні сироваткового AGP та/або поліпшених показниках росту тварини.

Результати також показують, що ксилоглюканаза ефективна в плані зниження рівнів сироваткового AGP. Ксилоглюканаза (ЕС 3.2.1.151) являє собою 1,4-β-глюканазу зі специфічністю у відношенні ксилоглюкану, структурного полімеру рослин.

За винятком літикази всі з ферментів, що використовують у даному прикладі, продукуються *B. lentus*. Літиказу продукує *A. luteus*, що перекласифікований в *Cellulosimicrobium cellulans*. Показано, що при ферментації *A. luteus* утворюється багато форм 1,3-β-глюканази. Див., наприклад, статтю Ferrer, P. *Microb Cell Factories* 5:10, 2006, опубліковану в режимі прямого доступу 17 березня 2006. doi: 10.1186/1475-2859-5-10). Вищенаведені результати показують, що літиказа знижує рівень курячого сироваткового AGP щонайменше також, як препарат 1,3-β-глюканази *B. lentus*, показуючи, що джерело ферменту не є важливим. Це значить, що можна використовувати ферменти з будь-якого джерела відповідно до винаходу. Крім того, можливо, що хітиназа (як показано Sigma, що є присутньою у літиказі) може поліпшувати ефективність лікування літиказою.

Приклад 15

Для оцінки активності ферментів можна використовувати наступні аналізи

(I) Ксилоглюканаза

Літиказу, неочищений продукт 1,3-β-глюканази, одержуваний при ферментації *Arthrobacter luteus*, одержують у фірмі Sigma Chemical Company, St. Louis Mo. Активність літикази визначають нижчеописаним способом редукуючих цукрів, і використовують у концентрації 60 MU/t (еквівалентно 240000 MO/t). Згідно даним виробника, даний продукт містить також інші активності, включаючи активність хітинази, що не вимірюють

Активність ксилоглюканази можна оцінити, використовуючи наступний протокол:

Реагент DNS: 10 г/л NaOH, 2 г/л феноли, 10 г/л динітросаліцилової кислоти, 1200 г/л тартрата калію натрію тетрагідрата, готують щодня. Безпосередньо перед використанням додають 0,5 г/л безводного сульфату натрію.

Стандартні розчини та стандартна крива: готують серію стандартних розчинів D-(+)-манози шляхом розчинення у воді в інтервалі концентрацій 0,1-0,5 г/л. 0,6 мл кожного стандарту манози (у двох або трьох повторях) додають до 1,5 мл робочого розчину DNS у скляних пробірках 13x100 мм. Зразок з аліквотою води 0,6 мл можна використати як контрольний реагент для нульового значення на спектрофотометрі. Розчини нагрівають у киплячій воді протягом 5 хвилин, охолоджують до температури навколишнього середовища та зчитують поглинання при довжині хвилі 550 нм. Очікуваний результат являє собою лінійну залежність доза-відповідь в інтервалі між 0,20 та 1,2 одиницями O.D. (оптичної щільності). Нахил стандартної кривої (O.D. 550/г/л манози) розраховують тільки за лінійною частиною кривої. При даному нахилі величину редукуючого цукру у г/л визначають у реакціях ферменту.

Ксилоглюкановий субстрат: Ксилоглюкан (тамаринд) одержують із фірми Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co., Ireland, розчиняють у концентрації 5 г/л в 50 мм Тріс-буфері, pH 7,5 з 0,05% глюкози.

Умови реакції: 0,25 мл ксилоглюканового субстрату в концентрації 5 г/л використовують із 0,05 мл розведення ферменту в 50 mM Тріс-буфері, та інкубують реакційну суміш при 40°C. Для зупинення реакції додають 0,75 мл реагенту DNS і зупинену реакційну суміш нагрівають у киплячій водній бані протягом п'яти хвилин та потім

охладжують перед зчитуванням поглинання при довжині хвилі 550 нм. Нульову точку часу з розчином ферменту використовують для визначення фонового рівня.

Розрахунок: MU ксилотрансферази ChemGen визначають як здатність до утворення 0,72 г редуруючого цукру/хв. (при використанні манози, редууючого цукру, як стандарт). Одна MU ChemGen еквівалентна 4000 MO. Інакше кажучи, одна одиниця CG еквівалентна 250 MO ($MO = 1,0 \text{ мкмоль/хв.}$).

(II) β -1,3-глюканаза

Активність β -1,3-глюканази можна оцінити при використанні наступного протоколу:

У даному аналізі використовують той же реагент DNS, стандартні розчини, стандартну криву та розрахунок одиниць ферменту, та кількість розведень, як описано вище для аналізу ксилотрансферази. Використовуваний буфер являє собою 50 mM буфер MOPS (4-морфолінпропансульфонову кислоту, $FW=209,26$) із pH 6,5.

Субстрат CM Pachyman: Карбоксиметил Pachyman (CM Pachyman, CMP) одержують в Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co., Ireland. Субстрат CMP готують у концентрації 5 г/л шляхом повільного додавання CMP у 50 mM розчин буферу MOPS (pH 6,5) при швидкому перемішуванні при приблизно 90°C. Порошок ферменту добре диспергують та ємність щільно закривають або запечатують, при цьому суспензію повільно нагрівають до кипіння та кип'ятять при повільному нагріванні на підігрівальній плиті, з перемішуванням, щоб одержати повністю гідратований гель, що не містить маленьких грудочок негідратованого гелю, видимих у розчині. Розчин проохолоджують до кімнатної температури, зберігають при 4°C, коли не використовують, та перемішують перед використанням після зберігання.

Умови реакції: 0,25 мл субстрату CM Pachyman у концентрації 5 г/л використовують із 0,05 мл розчину ферменту в буфері MOPS та реакційну суміш інкубують при 40°C протягом різних періодів часу до 45 хвилин. Для зупинення реакції додають 0,75 мл реагенту DNS. Зупинену реакційну суміш нагрівають у киплячій водній бані протягом п'яти хвилин та потім проохолоджують перед зчитуванням поглинання при довжині хвилі 550 нм. Нульову точку часу з розчином ферменту використовують для визначення фонового рівня.

(III) Хітиназа

Активність хітинази можна визначити, використовуючи флуорогенний хітиновий субстрат, описаний у статті Thompson et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 4001-008 (2001), 4-

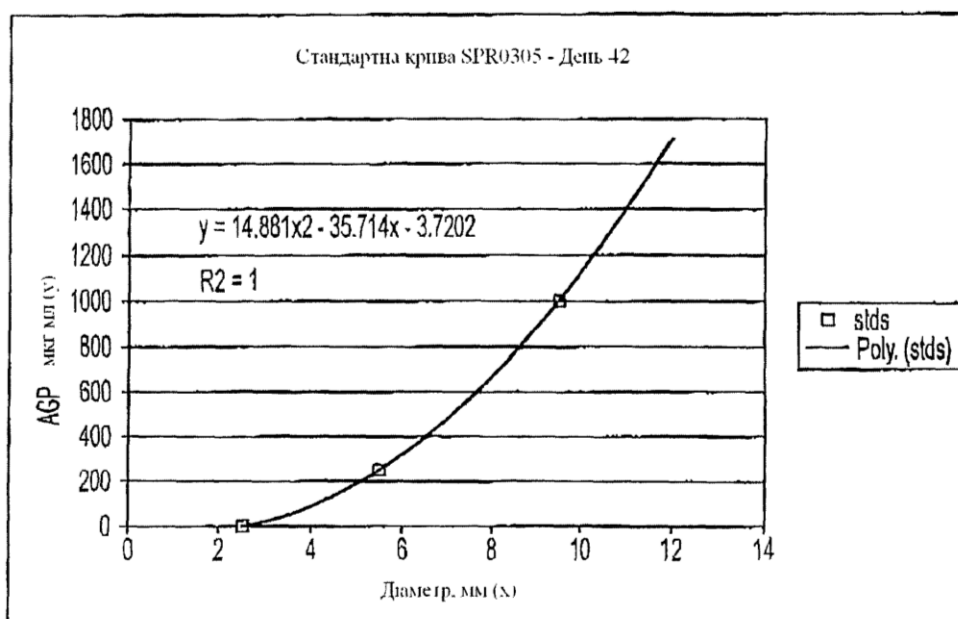
метилумбеліферил- β -D-N,N',N'',N'''-тетраацетилхітотриазид. Субстрат розчиняють у ДМСО (диметилсульфоксиді) у концентрації 2,5 mM.

В ілюстративному аналізі використовують 20 мкл хітинового субстрату (2,5 mM) з 150 мкл Tris (20,0 mM, pH 7,5). Субстратну суміш поміщають у чорний 98-лунковий планшет для мікротитрування та попередньо нагрівають до 37°C протягом 10 хвилин. Багато повторів реакцій починають із додавання 30 мкл розведеного ферменту та продовжують інкубування при 37°C. Окремі реакції зупиняють на 2, 4, 6, 8 та 10 хвилинах за допомогою 50 мкл 3M Na_2CaO_3 . Флуоресценцію зчитують у рідері для планшетів для мікротитрування (Fluoroscan II), використовуючи довжини хвиль збуджуючої смуги пропускання фільтру хвилі 355 нм та емісійної смуги пропускання фільтру хвилі 460 нм. Фермент розводять таким чином, що 4-метилумбеліферон утворювався з лінійною швидкістю в плані реакції та в інтервалі стандартної кривої, отриманої в умовах, ідентичних умовам аналізу ферменту, але під час відсутності ферменту та субстрату. Вивільнення одного мікромоля 4-метилумбеліферону у хвилину визначають як одну MO. Стандартну криву одержують із декількох концентраціями від нуля до 1×10^{-4} мікромоля 4-метилумбеліферону у 200 мкл реакційного буферного розчину з наступним додаванням 50 мкл 3M Na_2CaO_3 .

Хоча винахід описаний та проілюстрований досить докладно, для компетентних фахівців в галузі його здійснення та застосування повинні бути очевидні різні альтернативні варіанти, модифікації та удосконалення, що не виходять із сутності та обсягу винаходу. Приклади, наведені в даному контексті представляють кращі варіанти, є ілюстративними та не призначені для обмеження обсягу винаходу. Для компетентних фахівців в галузі техніки будуть мати місце модифікації в них та інші варіанти застосування. Дані модифікації охоплюються сутністю винаходу та визначені обсягом формули винаходу.

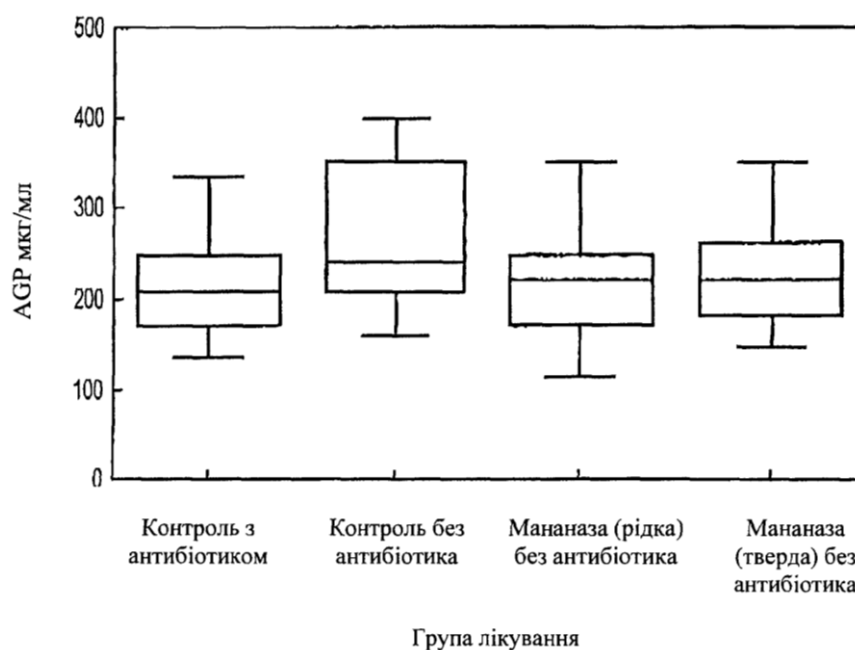
Компетентному фахівцеві в галузі техніки буде очевидно, що у винаході, описаному в даному контексті, можна зробити різні заміни та модифікації, не виходячи з обсягу та сутності винаходу.

Всі патенти та публікації, згадані в описі, показують рівні звичайних фахівців в галузі техніки, до якої належить винахід. Всі патенти та публікації в даному контексті включені у вигляді посилання тією самою мірою, як якби для кожної окремої публікації було спеціально та окремо зазначено, що вона включена за допомогою посилання.

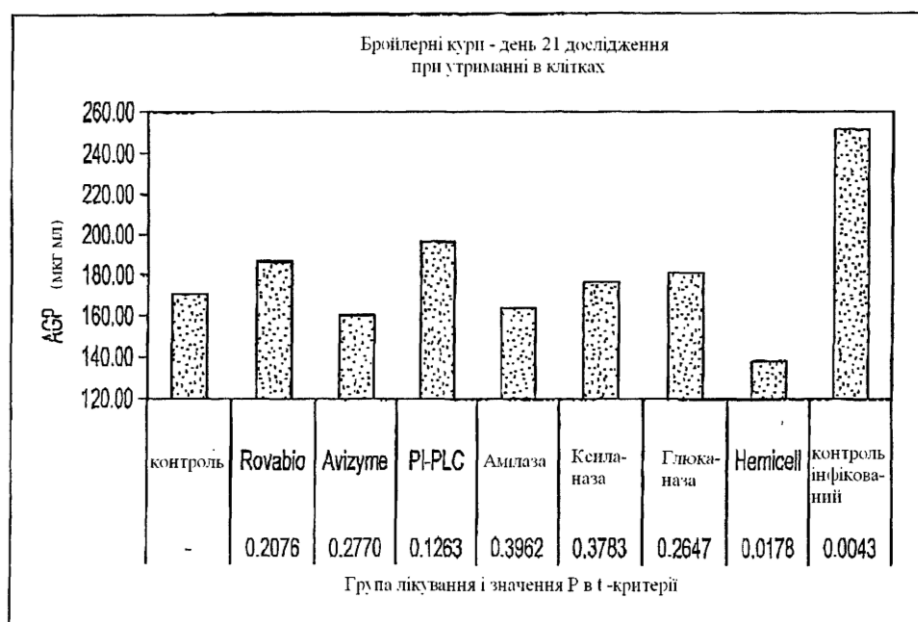


ФІГ. 1

SPR 0805 α-1 кислий глікопротеїн крові (AGP)
Два препарата мананази відносно антибіотика BMD



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4