



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 04 879 T2 2004.06.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 237 569 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 04 879.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/12442**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 987 375.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/041795**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **14.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **27.08.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.06.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 38/48**

**A61K 31/205, A23K 1/16, A61P 31/04**

(30) Unionspriorität:

**9929152            09.12.1999        GB**

(73) Patentinhaber:

**Finnfeeds International Ltd., Marlborough,  
Wiltshire, GB**

(74) Vertreter:

**HOFFMANN · EITLE, 81925 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**APAJALAHTI, Juha Heikki Antero, FIN-00670  
Helsinki, FI; RAUTONEN, Nina, FIN-02170 Espoo,  
FI; BEDFORD, Michael Richard, Marlborough,  
Wiltshire SN8 1AA, GB**

(54) Bezeichnung: **TIERFUTTERMITTELZUSATZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft einen Zusatzstoff für ein Tiernahrungsmittel und insbesondere einen Zusatzstoff, der die Rate an Gewichtszunahme eines Tiers, das mit diesem enthaltenen Nahrungsmittel gefüttert wird, verbessert. Sie betrifft weiterhin einen Zusatzstoff, der bei der Behandlung und/oder Vorbeugung von Kokzidiose und/oder einer bakteriellen Infektion einschließlich solchen, die zu einer nekrotischen Enteritis führen können, nützlich ist.

[0002] Das Halten von verschiedenen Tierarten ist zur Herstellung von Nahrungsmitteln zum menschlichen Verbrauch in der ganzen Welt wichtig. Während die Tiere gehalten werden, können sie mit einer Vielzahl von Infektionen verursachenden Bakterien und Parasiten, wie Eimeria, Campylobacter, Clostridium, Salmonella E. coli und Listerien in Kontakt kommen.

[0003] Kokzidiose ist eine häufige Ursache für Erkrankungen bei Intensivbeständen auf Farmen, insbesondere bei Geflügel. Kokzidiose wird durch Protozoen verursacht, einem einzelligen Parasiten, dem subphylum Apicomplexa. Viele dieser Arten, die diese Erkrankung bei Haustieren verursachen können, gehören zur Gattung Eimeria. Die Parasiten vermehren sich im Epithel des Darms. Bei Hühnern wurden sieben Arten von Eimeria identifiziert, fünf von diesen werden als pathogen angesehen. Diese sind E. acervulina, E. maxima, E. necatrix, E. tenella und E. brunetti.

[0004] Kokzidien sind ubiquitäre Organismen und sind im allgemeinen endemisch wo immer Hühner aufgezogen werden. Das Ausbrechen dieser Erkrankung kann von schweren bis sehr milden Infektionen variieren. Wie bei vielen parasitären Protozoen ist der Lebenszyklus von Eimeria relativ komplex.

[0005] Geschlechtliche und nicht geschlechtliche Vermehrung geschehen innerhalb des Darms der Hühner. Während dieses Vermehrungsverfahrens und der Entwicklung des Parasits wird das Wirtsgewebe zerstört, dies führt zu verschiedenen klinischen Manifestationen, die beim Ausbrechen von Kokzidiose beobachtet werden können. Die hergestellten und ausgeschiedenen Oozysten entwickeln sich außerhalb des Wirts weiter, dort können sie einer weiteren Entwicklung unterliegen und andere Hühner infizieren. Oozysten können tatsächlich außerhalb des Wirts für einen langen Zeitraum überleben, dies erlaubt ihnen, andere Vögel, selbst nach Entfernen des anfänglich infizierten Wirts, zu infizieren. Sie können sich selbst zwischen Herden über andere Wege ausbreiten, einschließlich dem Menschen, Haustieren, Insekten, Nagern, Staub und anderen Vögeln.

[0006] Sporulierende Oozysten enthalten vier Sporozysten, diese enthalten jeweils zwei Sporozoiten. Diese Sporozoiten werden durch mechanische und enzymatische Einwirkung im Verdauungstrakt der Hühner freigesetzt. Dies erlaubt ihnen, die Epitelzellen im Darm oder Blinddarm in Abhängigkeit von der involvierten Eimeriaart zu besiedeln. Obwohl es Unterschiede in der Pathogenität zwischen den Arten und Stämmen von Eimeria gibt, sind die Symptome, die von einem infizierten Tier aufgezeigt werden, mehr oder weniger eines der folgenden: Blutropfen, hohe Sterblichkeit, allgemeine Lethargie, Abmagerung, ein deutlicher Abfall im Nahrungsvverbrauch, Diarrhoe und ein Abfall bei der Eierproduktion. Es wurde geschätzt, dass Kokzidiose für ungefähr 6 bis 10% der ungewollten Sterblichkeit unter Geflügelbeständen verantwortlich ist. Weiterhin führt die subklinische Erkrankung zu einer Erhöhung der Nahrungsumwandlungsverhältnisse (feed conversion ratios (FCR)) und einer reduzierten Leistung. Entsprechend sind die wirtschaftlichen Konsequenzen dieser Erkrankungen bemerkenswert und in höchstem Maße ungewollt.

[0007] Verschiedene Verfahren wurden untersucht, um Kokzidiose zu bekämpfen. Versuche wurden gemacht, die Erkrankung durch Management-Strategien, aufbauend auf hohen Hygienestandards zusammen mit der Verwendung von chemischen Desinfektionsmitteln in der Umgebung des Geflügels zu kontrollieren. Aber selbst unter bedenkliehen hygienischen Bedingungen stellte es sich als unmöglich heraus, Kokzidiose auszurotten, obwohl sich zeigte, dass solche Mittel den anfänglichen Infektionsdruck im Geflügelhaus verringern. Sowohl lebende als auch attenuierte Vakzine wurden als Regulationsverfahren untersucht, sie sind allerdings relativ teuer und neigen dazu, die Wachstumsrate der Tiere aufgrund ihrer Wirkung zu unterdrücken.

[0008] Zur Zeit wird Kokzidiose bei Geflügel routinemäßig durch Verwendung von relativ kostenträchtigen vorbeugenden Antikokzidiose-Arzneimittelprogrammen reguliert. Solche Programme versuchen, die kokzidalen Infektionen zu begrenzen und somit die Effekte eines subklinischen Ausbruchs dieser Erkrankung zu begrenzen. Dies wird üblicherweise durch kontinuierliches Einschließen von antikokzidalen Mitteln in die Nahrung von einem frühen Lebenszeitpunkt des Bestands bis kurz vor der Schlachtung der Hähnchen oder durch kontrolliertes Weglassen bei Legehühnern erreicht. Zuerst wurden nach Entwicklung diese Mittel individuell verwendet. Dies führte bei Parasitenstämmen häufig zur Entwicklung einer Arzneimittelresistenz. Zur Zeit wird versucht, die Kokzidiose durch kontinuierliches Zufügen von neuen Arzneimitteln zu kontrollieren oder durch Verwendung von Arzneimittelprogrammen, die eine rotierende Verwendung von antikokzidalen Mitteln von verschiedenen biochemischen Strukturen, entweder während der Wachstumsphase (Shuttleprogramme) oder in häufigen Intervallen (Rotationsprogramme). Abgesehen von der routinemäßigen Verwendung von antikokzidalen Mitteln in Nahrungsmitteln für Geflügel wird eine subklinische Kokzidiose in der Mehrzahl der Geflügel-farmen gefunden.

- [0009] Innere Salze von quaternären Aminocarbonsäuren funktionieren als Osmoprotektoren. Solche Salze erhöhen die osmotische Stärke der Zellen ohne nachteilig die Enzymaktivität zu beeinflussen und sie schützen Enzyme vor einer ionischen oder Temperaturinaktivierung (Nash et al., Aust. J. Plant Physiol. 9: 47–57 (1982); Yancey et al. Science 224: 1064–1069 (1982); Rudolph et al., Archives Biochem. Biophys. 245: 134–143 (1986); McCue & Hanson, Trends in Biotechnology 8: 358–362 (1990); Papageorgiou et al., Curr. Res. In Photosynthesis 1: 957–960 (1990)). Während einige Organismen (und Gewebe) innere Salze, wie Betain, in hohen Mengen unter osmotischem Stress durch osmotisch induzierte Synthese anreichern können, fehlt den meisten Tieren diese Fähigkeit, sie sind abhängig von der Aufnahme von exogenen inneren Salzen. Zum Beispiel zeigten isolierte Mitochondrien von Lachsleber eine erhöhte Betain-Aufnahme aber keine -Synthese, wenn sie osmotischem Stress ausgesetzt wurden (G. Bjorkoy, Synthesis and Accumulation of glycine betaine in Salmon (*Salmo salar*) and Mussels, MSc thesis, Norwegian College of Fisheries, Universität von Tromsø, Seite 94).
- [0010] Die Verwendung von Betain zur Behandlung von Kokzidiose ist offenbart in der US 5,834,473. Die kombinierte Verwendung von Betain und einem Coccidiostat zum gleichen Zweck wird in der WO 94/24886 gelehrt. EP-A-0 681 787 schlägt die Verwendung von Enzymen, wie einer Protease und/oder einer Carbohyd- rase zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Kokzidiose vor.
- [0011] GB-A-2 327 345 lehrt, dass bakterielle Infektionen im Ileum von Beständen behandelt werden können durch Einfügen in Tiernahrungsmittel von Enzymen, die den Verdau des Nahrungsmittels fördern. Solche En- zyme bauen Polysaccharide, die in Getreidekomponenten des Nahrungsmittels vorhanden sind, in Oligosac- charide ab, die als Nahrungsquelle für den Wirt nützliche Mikroorganismen, die in den Eingeweiden vorhanden sind, vorteilhaft sind. Durch diese Vermehrung können pathogene Bakterien aufgrund des kompetitiven Aus- schlussverfahrens nicht emporkommen. Diese Strategie ist im allgemeinen wirksamer, wenn die Nahrungs- qualität gering ist (Classen et al., Proc. 2. Eur. Symp. on Feed Enzymes, 1995, 65; Pack and Bedford, Poultry International, 1998, 43).
- [0012] JP-A-01 238538 und JP-A-01 132533 lehren die kombinierte Verwendung von Betain und verschie- denen Enzymen zur Verbesserung der Verdauungsfunktion bei Tieren. Keines dieser Dokumente schlägt aller- dings die Verwendung von solchen Kombinationen zur Behandlung oder Vorbeugung von Kokzidiose oder Bakterieninfektionen oder zur Unterstützung der Aufrechterhaltung der Wachstumsrate bei Tieren, die einer kokzidialen Provokation ausgesetzt sind, vor.
- [0013] Eine der problematischsten Erkrankungen in Beständen ist die nekrotische Enteritis aufgrund von Clostridium perfringens. Clostridium-Infektionen geht üblicherweise eine Kokzidiose voraus. Kokzidiose um- fasst eine Immunantwort des Tieres, so dass das Tier weniger in der Lage ist zu antworten, wenn es anschlie- ßend einer Bakterieninfektion ausgesetzt ist.
- [0014] Allerdings können auch andere Faktoren, wie Stress, eine Überbesetzung oder Verschmutzung eben- falls dazu beitragen. Nekrotische Enteritis wird üblicherweise durch Versetzen der Tiernahrung mit wasserlös- lichem Zinkbacitracin, Virginamycin oder Penicillin behandelt.
- [0015] In der folgenden Beschreibung und den Ansprüchen wird Bezug genommen auf Einheiten der Prote- aseaktivität, Einheiten der Xylanaseaktivität und Einheiten der  $\alpha$ -Amylaseaktivität. Diese Aktivitäten in einer Enzymvornischung oder Flüssigenzymmischung werden wie folgt bestimmt.

#### Bestimmungsverfahren Proteaseaktivität

- [0016] Eine Einheit Proteaseaktivität ist die Menge an Enzym, die aus dem Substrat 1  $\mu$ g einer phenolischen Verbindung (ausgedrückt als Tyrosinäquivalente) in einer Minute unter den beschriebenen Bedingungen frei- setzt.

#### Reagenz

##### 1. 0,6% (G/V) Caseinsubstrat

- [0017] Abwiegen von 0,6 g trockenem Hammarsten Casein (Merck 2242) in ein 200 ml Becherglas. Befeuch- ten mit einer kleinen Menge (ca. 5 ml) destilliertem Wasser. Wenn das Casein kräftig befeuchtet wurde, werden 20 ml 0,2 M Dinatrium-Hydrogenphosphatlösung hinzugegeben. Erwärmen der Mischung auf +60°C unter Rühren, bis das Casein sich löst und eine Opallösung erhalten wird. Zufügen von 60 ml destilliertem Wasser und, wenn notwendig, von 1 bis 2 Tropfen Octylalkohol (Antischaummittel; ähnliche Produkte können verwen- det werden). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur Einstellen des pHs auf 7,5 mit 0,5 M Natriumhydroxid und 1 M Milchsäure. Überführen der Lösung in einen Messkolben und Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser.
- [0018] Die Substratlösung ist für eine Woche verwendbar, wenn sie in einem kalten Raum gelagert wird.

2. 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung

[0019] Lösen von 17,80 g Dinatrium-Hydrogenphosphatdihydrat in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 500 ml mit destilliertem Wasser.

3. 0,02 M NaCl-Lösung

[0020] Lösen von 1,168 g Natriumchlorid in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser.

4. Präzipitationsreagenz (TCA)

[0021] Lösen von 18,80 g Trichloressigsäure (CCl<sub>3</sub>COOH), 18,10 g wasserfreiem Natriumacetat (CH<sub>3</sub>COONa) und 18,80 g Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser.

5. Phenolreagenz

[0022] Mischen von einem Teil Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz mit einem Teil destilliertem Wasser kurz vor dem Assay.

6. 0,55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung

[0023] Lösung von 58,295 g Dinatriumcarbonat in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser.

1. Enzymprobe

[0024] Äquilibrieren von 1 ml Enzymlösung (in 0,02 M NaCl-Lösung) bei +40°C (für ca. 5 Minuten). Zufügen von 5 ml äquilibriertem Caseinsubstrat, Rühren und Inkubieren bei +40°C für genau 30 Minuten. Zugabe von 5 ml Präzipitationsreagenz und Rühren. Inkubieren bei +40°C für genau 30 Minuten und sofortiges Abfiltrieren mit Filterpapier (Whatman 1 oder Macherey Nagel 640 we).

[0025] Pipettieren von 2 ml Filtrat, 5 ml 0,55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 1 ml Phenolreagenz. Rühren und Inkubieren bei +40°C für 30 Minuten. Abkühlen auf Raumtemperatur und Messen der Absorption bei 660 nm gegenüber destilliertem Wasser.

2. Enzymnullwert

[0026] Äquilibrieren von 1 ml Enzymlösung (in 0,02 M NaCl-Lösung) bei +40°C (für ca. 5 Minuten). Zugabe von 5 ml Präzipitationsreagenz, Rühren und Inkubieren bei +40°C für genau 30 Minuten. Zugabe von 5 ml Caseinsubstrat, Rühren und Inkubieren bei +40°C für genau 30 Minuten. Sofortiges Filtrieren mit Filterpapier (Whatman 1 oder Macherey Nagel 640 we).

[0027] Behandeln des Filtrats wie bei der Enzymprobe.

[0028] Die Differenz der Absorption zwischen der Enzymprobe und dem Enzymnullwert sollte bei 0,2 bis 0,5 sein.

3. Standardkurve

[0029] Herstellen einer Tyrosin-Stocklösung durch Einwiegen von 10 mg L-Tyrosin in einen Messkolben, Lösen in 0,02 M NaCl-Lösung und Auffüllen auf 100 ml mit 0,02 M NaCl-Lösung.

[0030] Herstellung von Verdünnungen der Tyrosin-Stocklösung in 0,02 M NaCl-Lösung wie folgt:

1 : 50	=	2 μg/ml
1 : 20	=	5 μg/ml
1 : 10	=	10 μg/ml
1 : 5	=	20 μg/ml
1 : 3	=	33 μg/ml
1 : 2	=	50 μg/ml

Pipettieren von 2 ml der jeweiligen Tyrosinlösung, 5 ml 0,55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 1 ml Phenolreagenz. Rühren und Inkubieren bei +40°C für 30 Minuten. Abkühlen auf Raumtemperatur und Messen der Absorption bei 660 nm gegen destilliertes Wasser.

[0031] Auftragen der Tyrosinkonzentration als Funktion der Absorption.

#### Berechnung

[0032] Die Proteaseaktivität der Probe wird gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität (U/g)} = \frac{[A(X) - A(O)] \times k \times F \times Df}{t}$$

worin:

A(X) = Absorption der Enzymprobe

A(O) = Absorption des Enzymnullwerte

k = die Steigung der Standardkurve

F = Reaktionverdünnungsfaktor (=11)

Df = Verdünnungsfaktor (ml/g)

t = Reaktionszeit (30 Minuten).

#### Assayverfahren für die Xylanase-Aktivität

[0033] Eine Einheit Xylanase-Aktivität ist die Menge an Enzym, die 1 µM reduzierenden Zucker (ausgedrückt als Xyloseäquivalente) von dem Substrat in einer Minute unter den beschriebenen Bedingungen freisetzt.

#### Reagenzien

##### 1. 1% (G/V) Xylansubstrat

[0034] Zugabe von 10 ml 0,5 M Natriumhydroxid zu 1,0 g Xylan (Fluka 95590). Mischen für 30 Minuten mit einem Magnetrührer. Zugabe von 40 ml 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3. Einstellen des pHs auf 5,3 mit 1 M Essigsäure. Auffüllen auf 100 ml mit 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3. Das Substrat sollte bei Verwendung die ganze Zeit gemischt werden.

##### 2. 1 M Essigsäure

[0035] Pipettieren von 5,7 ml Eisessig in einen Messkolben und Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser.

##### 3. 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3

A. Lösen von 4,1 g Natriumacetat in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser.

B. Lösen von 3,0 g Eisessig in destilliertem Wasser und Auffüllen auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser.

[0036] Einstellen des pHs der Lösung A auf pH 5,3 mit Lösung B.

##### 4. Dinitrosalicylsäure(DNS)reagenz

[0037] Suspendieren von 20,0 g 3,5-Dinitrosalicylsäure in ca. 800 ml destilliertem Wasser. Graduelles Zugabe von 300 ml Natriumhydroxidlösung (32,0 g NaOH in 300 ml destilliertem Wasser) unter kontrolliertem Rühren. Erwärmen der Suspension in einem Wasserbad (die Temperatur darf nicht +48°C übersteigen) unter Rühren, bis die Lösung klar wird. Graduelles Zugabe von 600 g Kaliumnatriumtartrat. Erwärmen der Lösung (die Temperatur darf nicht +48°C übersteigen) wenn notwendig, bis die Lösung klar ist.

[0038] Auffüllen auf 2.000 ml mit destilliertem Wasser und Filtrieren durch einen grob gesinterten Glasfilter.

[0039] Aufbewahren in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur. Das Reagenz ist für maximal 6 Monate stabil.

## Verfahren

## 1. Enzymprobe

[0040] 1 ml Enzymlösung (in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3) wird bei +50°C äquilibriert. 1 ml Xylansubstrat werden zugegeben, gerührt und bei +50°C für genau 30 Minuten inkubiert. 3 ml DNS-reagenz werden zugegeben, gerührt und die Reaktionsmischung wird für genau 5 Minuten gekocht. Abkühlen der Reaktionsmischung in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur und Messen der Absorption bei 540 nm gegen destilliertes Wasser.

## 2. Enzymnullwert

[0041] Inkubieren von 1 ml Xylansubstrat bei +50°C für 30 Minuten. Zugabe von 3 ml DNS-Lösung und Rühren. Zugabe von 1 ml Enzymverdünnung (in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3) und Rühren. Kochen der Mischung für exakt 5 Minuten. Abkühlen der Reaktionsmischung in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur und Messen der Absorption bei 540 nm gegen destilliertes Wasser.

[0042] Die Differenz der Absorption zwischen der Enzymprobe und dem Enzymnullwert sollte bei 0,3 bis 0,5 liegen.

## 3. Standardkurve

[0043] Herstellen von Standardlösungen aus wasserfreier Xylose in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3. Die Xylosekonzentration der Standards sollte bei 0,05 bis 0,5 mg/ml liegen. Pipettieren von 1 ml Standardlösung, 1 ml Xylansubstrat und 3 ml DNS-Reagenz in ein Teströhrchen. Rühren und für genau 5 Minuten Kochen. Abkühlen in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur und Messen der Absorption bei 540 nm gegen den Standardnullwert. In dem Standardnullwert wird die Xyloselösung durch 1 ml 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,3, ersetzt. Ansonsten wird der Standardnullwert genauso wie der Xylosestandard behandelt.

[0044] Auftragen der Xylosekonzentration als Funktion der Absorption. Eine neue Standardkurve wird für jedes neue DNS-Reagenz hergestellt.

## Berechnung

[0045] Die Xylanase-Aktivität der Probe wird gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität (U/g)} = \frac{([A(X) - A(O)] \times k + C_o) \times 1000 \times D_f}{Mw_{xy} \times t}$$

worin:

A(X) = Absorption der Enzymprobe

A(O) = Absorption des Enzymnullwerts

k = Steigung der Standardkurve

C<sub>o</sub> = Schnittpunkt der Xylosestandardkurve?

1000 = Faktor, mM → μM

D<sub>f</sub> = Verdünnungsfaktor (ml/g)

Mw<sub>xy</sub> = Molekulargewicht Xylose (150,13 mg/mM)

t = Reaktionszeit (30 Minuten).

## Assayverfahren für α-Amylase-Aktivität

[0046] Eine Einheit α-Amylase-Aktivität katalysiert ein μl der Hydrolyse von glycosidischen Verbindungen in einer Minute unter den beschriebenen Bedingungen.

## Reagenz

## 1. Substrat

[0047] Als Substrat wird eine Phadebas Amylase-Testtablette zur in vitro diagnostischen Verwendung (Pharmacia Diagnostics) benutzt. Die Tabletten werden in destilliertem Wasser aus wasserunlöslichem blauem Stärkopolymer, Rinderserumalbumin und Puffer hergestellt.

## 2. Reagenzlösung

[0048] Verdünnen von 9,0 g Natriumchlorid, 2,0 g Rinderserumalbumin und 2,2 g Calciumchlorid in destilliertem Wasser in einem Messkolben und Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser.

## 3. 0,5 M NaOH-Lösung

[0049] Lösen von 20,0 g Natriumhydroxid in destilliertem Wasser in einem Messkolben und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml.

## 4. Filterpapier

[0050] Macherey Nagel 640 mit oder ähnliches.

## Verfahren

## 1. Enzymprobe

[0051] Pipettieren von 200 µl geeigneter Enzymverdünnung in Reagenzlösung und 4,0 ml Reagenzlösung in ein Teströhrchen. Äquilibrieren bei +37°C für 5 Minuten. Zugabe der Substratablette mit der Pinzette und gutes Mischen für 10 Sekunden. Inkubieren bei +37°C für genau 15 Minuten. Die Reaktionszeit startet mit der Zugabe der Tablette. Zugabe von 1,0 ml der 0,5 M NaOH-Lösung und gutes Rühren. Filtrieren oder Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 10 Minuten und Messen der Absorption gegenüber Reagenznullwert bei 620 nm.

[0052] Die Absorption der Enzymprobe sollte 0,3 bis 0,5 sein.

## 2. Reagenznullwert

[0053] Äquilibrieren von 4,2 ml Reagenzlösung bei +37°C 5 Minuten. Zugabe der Substratablette mit Pinzeten und gutes Rühren für 10 Sekunden. Inkubieren bei +37°C für genau 15 Minuten. Zufügen von 1,0 ml 0,5 M NaOH-Lösung, gutes Rühren und Filtrieren oder Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 10 Minuten.

## Berechnung

[0054] Die Absorption der Probe ist proportional zu der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität der Enzymlösung wird ausgelesen aus der Tabelle, die dem Tablettenkit beigelegt ist. Für jedes Tablettenbatch wird eine kalibrierte Tabelle geliefert.

[0055] Die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität der Probe wird berechnet wie folgt:

$$\text{Aktivität (U/g)} = \frac{\text{Act} \times \text{Df}}{1000}$$

wobei:

Act =  $\alpha$ -Amylase-Aktivitätswert (ausgedrückt in U/l) der Enzymverdünnung, wie sie aus der Phadebas Amylase Testtabelle gelesen wird.

Df = Verdünnungsfaktor (ml/g)

1000 = Faktor, um 1 in ml umzuwandeln.

[0056] Ein erstes Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Kombination von Verbindungen zum Einfügen zu Tiernahrungsmittel, um die Rate der Gewichtszunahme bei gesunden Tieren zu verbessern. Ein zweites Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer solchen Kombination zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Kokzidiose oder von Bakterieninfektionen, wie nekrotische Enteritis, bereitzustellen. Es ist ein drittes Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Kombination von Zusatzstoffen für ein Tiernahrungsmittel bereitzustellen, um die Wirkung einer Eimeria-Provokation, die die Gewichtszunahmerate bei einem Tier erniedrigt, entgegenzuwirken.

[0057] Entsprechend betrifft ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung der Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Kokzidiose.

[0058] Gemäß einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer Eimeria-Infektion beim Tier bereit.

[0059] Gemäß einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Nahrungszusatzmittels zur

Förderung der Gewichtszunahme bei einem Tier, das mit *Eimeria* infiziert ist, bereit.

[0060] Gemäß einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer bakteriellen Infektion, hervorgerufen durch Salmonellen, *Camphylobacter*, *E. coli* oder Listerien.

[0061] Gemäß einem fünften Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung oder Prophylaxe von nekrotischer Enteritis, die unter anderem durch *Clostridium perfringens*-Infektion hervorgerufen wird, bereit.

[0062] Gemäß einem sechsten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Zusatzstoffes für eine Tiernahrung bereit, umfassend eine Protease, eine Xylanase und ein inneres Salz einer quaternären Aminocarbonsäure bereit.

[0063] In jedem der obigen ersten bis fünften Aspekte ist es besonders bevorzugt, dass das Mittel oder Zusatzstoff weiterhin Xylanase umfasst.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0064] **Fig. 1** zeigt eine graphische Darstellung der Wirkungen eines Zufügens von Betain, Protease bzw. einer Kombination von Betain und Protease zur Nahrung bei gesunden Hähnchen.

[0065] **Fig. 2** zeigt eine graphische Darstellung der Wirkungen des Zufügens von Betain, Protease bzw. einer Kombination von Betain und Protease zu der Nahrung von Hähnchen, die mit *Eimeria maxima* provoziert wurden.

[0066] **Fig. 3** ist ein Gelchromatogramm, das das Vorhandensein von *C. perfringens* Toxigen im Ileum von Hähnchen, die mit in verschiedener Form versetzter Nahrung gefüttert wurden und die mit verschiedenen Pathogenen provoziert wurden, zeigt.

[0067] In der folgenden Beschreibung wird Bezug genommen auf verschiedene Verfahren, die den allgemeinen Stand der Technik für den Fachmann der Veterinär-Immunologie und Immunpathologie, für Vakzine, der Tierpharmazie und Tierhaltung darstellen. Publikationen und andere Materialien, die solche Verfahren darstellen, schließen ein:

Allgemeine Prinzipien der Veterinärwissenschaft ist z. B. aufgeführt in *The Merck Veterinary Manual*, 6. Auflage, herausgegeben von Fraser et al., 1986; *the Food and Drug Administration's FDA 1994 Feed Additive Compendium*, U.S. Food and Drug Administration, 1994; *Trends in Veterinary Research and Development*, Teil 6, *Anti-coccidials*, herausgegeben von Lloyd-Evans, L. P. M., PJB Publications Ltd., 1991; *Diseases of Poultry*, herausgegeben von B. W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991.

[0068] Allgemeine Prinzipien der Tierhaltung sind dargestellt in z. B. H. Partick et al., *Poultry: Feeds & Nutrition*, 2. Auflage, AVI Publishing Co. Inc., Westport, Conn. (1980).

[0069] Allgemeine Prinzipien der pharmazeutischen Wissenschaften sind z. B. dargestellt in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18. Auflage, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing, Easton, Pa. 1990).

[0070] Wie oben erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Kokzidiose, bakterieller Infektion oder nekrotischer Enteritis, die unter anderem durch *Clostridium perfringens*-Infektion hervorgerufen sein kann, bereit. Die Vorteile der Verwendung von Nahrung, die eine Kombination von Betain und einer Protease enthält ist bei Zuchtieren die, dass die Menge an antimikrobiellen Arzneimitteln, die bisher routinemäßig zu der Nahrung zugefügt wurde, reduziert werden kann oder in einigen Fällen sogar ganz weggelassen werden kann. In Ländern, wo solche Arzneimittel verboten sind, stellt dies einen neuen Ansatz zur Kontrolle von bakteriellen Erkrankungen dar.

[0071] Wenn die Antibiotika aus der Tiernahrung weggelassen werden, gibt es einige weitere mögliche Vorteile. Es war bisher notwendig, Antibiotika aus der Tiernahrung für eine bestimmte Zeit vor der Schlachtung herauszulassen. Dies stellte sicher, dass das Fleisch relativ frei von solchen Arzneimitteln war und somit für den humanen Verbrauch zur Verfügung stand. Wenn Antibiotika insgesamt für Tiernahrung weggelassen werden können, wie es mit der vorliegenden Erfindung erzielt werden kann, können Tiere in irgendeinem Alter geschlachtet werden, im Gegensatz zu vorher, wo eine bestimmte Zeit ohne Antibiotika notwendig war. Dies erlaubt dem Farmer eine verbesserte Flexibilität und vermeidet das Risiko, dass die Tiere kurz vor der Schlachtung infiziert werden. Weiterhin kann garantiert werden, dass das Fleisch und die Eier frei von Antibiotika sind. Solches Fleisch und Eier haben auf dem Markt einen Vorteil im Vergleich zu Produkten, die nicht mit einer solchen Garantie ausgestattet werden können.

[0072] Die vorliegende Erfindung hat auch in Bezug auf die menschliche Gesundheit Vorteile. Dessen Verwendung reduziert den Selektionsdruck für antibiotikaresistente Bakterienstämme, indem es ermöglicht, dass Antibiotika aus der Tiernahrung weggelassen werden kann. Entsprechend sind mehr Antibiotika zugängliche Stämme im Darm des Tiers vorhanden, dies stellt einen wahrscheinlicheren tödlichen Effekt sicher, wenn die Antibiotika unter äquivalenten Bedingungen beim Menschen verwendet werden.



[0073] Der Nahrungszusatzstoff gemäß der vorliegenden Erfindung kann verschiedenartig hergestellt werden. Zum Beispiel kann er hergestellt werden durch einfaches Vermischen der verschiedenen entsprechenden Verbindungen, um den Zusatzstoff zu produzieren. Dieser kann dann entweder direkt mit der Nahrung vermischt werden oder kann konventioneller auf ein Trägermaterial auf Getreidebasis, wie gemahlener Weizen, Mais oder Sojamehl imprägniert werden. Solch ein imprägnierter Träger stellt ebenfalls einen Nahrungszusatzstoff gemäß dem vierten Aspekt der vorliegenden Erfindung dar.

[0074] Der Nahrungszusatzstoff kann direkt mit der Tiernahrung vermischt werden oder kann alternativ mit ein oder mehreren anderen Nahrungszusatzstoffen, wie Vitamin-Nahrungszusatzstoff, einem Mineral-Nahrungszusatzstoff oder einem Aminosäure-Nahrungszusatzstoff vermischt werden. Der erhaltene Nahrungszusatzstoff, umfassend einige verschiedene Komponentenarten, kann dann in einer entsprechenden Menge mit der Nahrung vermischt werden. Es ist ebenfalls möglich, den Nahrungszusatzstoff in die Ernährung der Tiere durch zufügen zu einer zweiten (und verschiedenen) Nahrung oder ins Trinkwasser, zu dem das Tier ebenfalls Zugang hat, einzubringen. Entsprechend ist es nicht essentiell, dass der erfindungsgemäß bereitgestellte Zusatzstoff in die Hauptnahrung auf Getreidebasis des Tieres eingebaut wird, obwohl ein solcher Einbau einen besonders bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0075] Der erfindungsgemäß bereitgestellte Nahrungsmittelzusatzstoff kann als Vormix zusammen mit anderen Enzymen, die ebenfalls wünschenswert hinzugegeben werden können, formuliert sein. Der Vormix kann zu den Ausgangsmaterialien vor der Nahrungsmittelherstellung zugefügt werden, während der Herstellung oder als letztem Schritt, nachdem das Nahrungsmittel ansonsten verwendungsbereit ist. Es ist ebenfalls möglich, die Kombination des inneren Salzes und der Protease direkt zu dem Nahrungsmaterial, das als Pellets oder als Gemisch vorgeformt ist, hinzuzugeben.

[0076] Wenn der erfindungsgemäße Zusatzstoff zu einem Tiernahrungsmittel zugegeben ist, sollte das Nahrungsmittel mindestens 25 Gew.-% Getreide und bevorzugt mindestens 35 Gew.-% Getreide enthalten. Das Getreide kann eines oder mehrere aus Weizen, Mais, Reis, Hafer, Gerste, Triticum, Roggen und Sorghum. Es ist insbesondere bevorzugt, dass das Getreide Mais oder Weizen ist. Wenn das Getreide Mais ist, dann umfasst der Zusatzstoff oder das Mittel bevorzugt weiterhin eine  $\alpha$ -Amylase.

[0077] Obwohl die Getreidekomponente bei einer Nahrung auf Getreidebasis eine Proteinquelle darstellt, ist es normalerweise notwendig, weitere Quellen für ergänzendes Protein bei der Ernährung bereitzustellen, wie solches, das von Fischmehl, Fleischmehl oder Gemüse stammt. Diese Quellen für weiteres Protein können bis zu 50 Gew.-% der Tiernahrung ausmachen. Quellen für pflanzliches Protein schließen mindestens eines ein von Vollfettsojabohne, Rapssamen, Canola, Sojabohnenmehl, Rapssamenmehl und Canolamehl.

[0078] Ein inneres Salz einer quaternären Aminocarbonsäure hat die allgemeine Formel  $R^1R^2R^3N^+-L-COO^-$ , wobei die Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander irgendeinen organischen Rest, bevorzugt Alkylgruppen, bevorzugter Alkylgruppen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, und am meisten bevorzugt sind sie alle Methyl; die Verbindungsgruppe -L- stellt eine organische Verbindungsgruppe, wie Alkoxyalkyl oder Alkylen dar, bevorzugt  $C_1-C_6$ -Alkylen und am meisten bevorzugt Methylen. Beispiele des inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure schließen ein Betain ( $Me_3N^+CH_2COO^-$ ),  $Me_3N^+-CHMeCOO^-$ ,  $Et_3N^+CH_2COO^-$ ,  $Me_2EtN^+CH_2COO^-$ ,  $Me_3N^+CH_2CH_2COO^-$ ,  $Me_3N^+CH_2OCH_2COO^-$  und  $Me_3N^+C(CHMe_2)HCOO^-$ . Das innere Salz ist bevorzugt Betain, dieses ist kommerziell erhältlich von Finnfeeds unter dem Handelsnamen Betafin®.

[0079] Das innere Salz ist bevorzugt in der Nahrung in einer Rate von 0,01 bis 20 g/kg Nahrung enthalten, bevorzugter 0,1 bis 10 g/kg und am meisten bevorzugt 0,5 bis 2 g/kg.

[0080] Die Protease kann in irgendeiner Proteaseform verwendet werden, die die Verwendung eines Subtilisins, das von *Bacillus subtilis* stammt, mit einer Aktivität von nicht weniger als 40.000 U/g ist allerdings bevorzugt. Solche Subtilisine sind z. B. beschrieben in US 4,760,025 A. Die Protease ist in der Nahrung in einer Menge enthalten, dass die Nahrung eine Proteaseaktivität hat, die 100 U bis 100.000 U/kg Nahrung entspricht, bevorzugt 500 U bis 10.000 U/kg Nahrung. Geeignete Proteasen schließen ein, sind aber nicht auf sie begrenzt, die folgenden kommerziell erhältlichen Proteasen: Novo NEUTRASS (TM), (kommerziell erhältlich von Novo Nordisk); PURAFECT (TM) (kommerziell erhältlich von Genencor International, Inc); SAVINASE (TM) (kommerziell erhältlich von Novo Nordisk); MAXACAL (TM) (kommerziell erhältlich von Gist-Brocades); DURAZYM (TM) (kommerziell erhältlich von Novo Nordisk) und MAXAPEM (TM) (kommerziell erhältlich von Gist Brocades).

[0081] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Mittel oder der Zusatzstoff weiterhin eine Xylanase. Xylanasen können von Pilzquellen, wie *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Neocallimastix* oder *Thermomyces* stammen. Es ist bevorzugt, dass die Xylanase eine niedrig pI-Xylanase und/oder eine hoch pI-Xylanase, erhältlich von *Trichoderma longibrachiatum*, ist, wie im Beispiel 22 der WO 92/06209 beschrieben. Alternativ kann die Xylanase erhalten werden aus einem Bakterium, wie *Bacillus*, *Streptomyces*, *Microtraspota*, *Clostridium* oder *Ruminococcus*. Es ist ebenfalls möglich, dass die Xylanase erhalten werden kann von einem Wirt, der einer genetischen Veränderung unterworfen wurde, wie das Einfügen eines entsprechenden Gens in einen bakteriellen oder Pilzwirtsstamm. Die bevorzugte Aktivität der Xylanase sollte bei ca. 3.000 U/g liegen. Die Xylanase von *Trichoderma longibrachiatum* mit einer minimalen Aktivität von 3.000 U/g ist kom-

merziell erhältlich von Finnfeeds International unter dem Handelsnamen AVIZYME®. Die Xylanase ist zu der Nahrung in einer solchen Menge zugegeben, dass die Nahrung eine Xylanase-Aktivität aufweist, die 100 U bis 100.000 U/kg Nahrung entspricht, bevorzugt eine Aktivität von 200 U bis 1.000 U/kg Nahrung.

[0082] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann ebenfalls  $\alpha$ -Amylase in dem Mittel oder Zusatzstoff vorhanden sein, insbesondere dann, wenn das Mittel oder der Zusatzstoff zu einer Mais enthaltenden Nahrung zugegeben wird. Obwohl es im Umfang der Erfindung ist, irgendeine Form an  $\alpha$ -Amylase zu verwenden ist es bevorzugt,  $\alpha$ -Amylase von *Bazillus subtilis* mit einer minimalen Aktivität von 4.000 U/g zu verwenden.  $\alpha$ -Amylase von *Bazillus subtilis* mit einer minimalen Aktivität von 4.000 U/g ist kommerziell erhältlich von Finnfeeds International unter dem Handelsnamen AVIZYME®. Die in die Nahrung zugefügte  $\alpha$ -Amylase ist in der Nahrung in einer solchen Menge vorhanden, dass sie eine  $\alpha$ -Amylase-Aktivität entsprechend 10 bis 100.000 U/kg Nahrung aufzeigt, bevorzugt eine Aktivität von 100 U bis 4.000 U/kg Nahrung.

[0083] Das innere Salz, die Protease und gegebenenfalls die Xylanase und/oder  $\alpha$ -Amylase können vor Verwendung miteinander vermischt werden, sie können aber auch separat zu der Nahrung zugegeben werden. Eine Kombination von Protease, Xylanase und  $\alpha$ -Amylase ist kommerziell erhältlich unter dem Handelsnamen AVIZYME® 1510 von Finnfeeds International. Eine weitere Kombination dieser Enzyme ist kommerziell erhältlich als Trockenvormischung unter dem Handelsnamen AVIZYME® 1500. Es wird angemerkt, dass es im allgemeinen nicht empfehlenswert ist, eine Protease mit anderen Proteinen über einen längeren Zeitraum zu lagern, da diese dazu neigt, die anderen Proteine abzubauen.

[0084] Der erfindungsgemäße Nahrungszusatzstoff kann für einen weiten Bereich an Tieren verwendet werden, die Verwendung der Erfindung ist aber insbesondere bevorzugt bei Haustieren und Tieren in Viehbeständen. Tiere, die insbesondere von der Erfindung profitieren, schließen ein: Geflügel (wie Hühner, Truthähne, Enten und Gänse), Wiederkäuer (wie Kühe, Pferde und Schafe), Schweine (Ferkel), Nagetiere (wie Kaninchen) und Fische. Die Erfindung ist insbesondere vorteilhaft in Bezug auf Hähnchen.

[0085] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen an erfindungsgemäßen Zusatzstoff verabreicht werden um die negativen Wirkungen von irgendeinem Kokzidiose induzierenden Pathogen und insbesondere irgendeiner *Eimeria* Art einschließlich z. B. den *Eimeria*arten *necatrix*, *galloparvovis*, *meleagrimitis*, *innocua*, *meleagridis*, *subrotunda*, *dispersa*, *truncata*, *acervulina*, *brunetti*, *maxima*, *mitis*, *praecos* und *tenella* zu lindern. Insbesondere fördert der Zusatzstoff die Gewichtszunahme beim *Eimeria* infizierten Tier.

[0086] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden, um die nachteiligen Wirkungen bei Geflügel aufgrund der Infektion durch *Eimeria* Arten, insbesondere den *Eimeria* Arten *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecos* und *E. tenella* zu lindern.

[0087] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden um die negative Wirkung, die bei Rindern induziert wird, wenn sie mit einem Mitglied der *Eimeria* Arten infiziert werden, insbesondere den *Eimeria* *zernii*, *bovis* (*smithii*), *ellipsoidis*, zu lindern.

[0088] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden, um die negativen Wirkungen, die in Schafen induziert werden, wenn sie mit einem Mitglied der *Eimeria* Arten infiziert werden, insbesondere den *Eimeria*arten *arloingi* A (*ovina*), *weybridgensis* (*arlongis* B), *crandallis*, *ahsata*, *ovinoidealis*, *gilruthi*, zu lindern.

[0089] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden, um die negativen Wirkungen induziert in Ziegen, die mit einem Mitglied der *Eimeria* Arten infiziert sind, einschließlich z. B. Immunisierung mit den *Eimeria* Arten *arloingi*, *faurei*, *caprina*, *ninakohlyakimovae*, *christenseni*, zu lindern.

[0090] Erfindungsgemäß können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden, um negative Effekte, die in Schweinen, die mit einem Mitglied der *Eimeria* Arten infiziert sind, einschließlich z. B. der Induzierung mit den *Eimeria* Arten *debliecki*, *scabra*, *penninuta*, zu lindern einschließlich den negativen Effekten, die durch ein Mitglied der *Isospora* Arten, z. B. *Isospora suis*, induziert werden.

[0091] Gemäß der vorliegenden Erfindung können wirksame Mengen des erfindungsgemäßen Zusatzstoffes verabreicht werden, um die negativen Effekte einer Infektion mit Bakterien, wie *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* und insbesondere *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis* und *Campylobacter jejuni* bei Geflügel zu lindern. Da *Clostridium perfringens* eine der Hauptursachen für nekrotische Enteritis ist, kann der Nahrungszusatzstoff entsprechend zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung von nekrotischer Enteritis verwendet werden.

[0092] Weitere pharmazeutische Verfahren können angewendet werden, um die Wirkungsdauer zu regulieren. Die regulierte Zufuhr kann erzielt werden durch Auswahl entsprechender Makromoleküle wie Polyester, Polyaminosäuren, Polypyrrolidon, Ethylenvinylacetat, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose oder Protaminsulfat und Kombinationen dieser gemäß allgemein bekannter Verfahren, um die Freisetzung zu regulieren. Die Wirkungsdauer des inneren Salzes und der Protease kann reguliert werden durch Einfügen dieser Mittel in Partikel von polymeren Materialien, wie Polyester, Polyaminosäuren, Hydrogelen, Poly(milchsäure) oder Ethylenvinylacetat-Copolymer. Alternativ können das innere Salz in Mikrokapseln formuliert sein. Verschiedene Materialien und Methoden zur Herstellung und Verwendung von Mikrokapseln sind offenbart in Remington's Phar-

maceutical Sciences, (16. Auflage, A. Oslow, ed., Mack, Easton, PA. 1980).

[0093] Zusätzlich zu der Ausführungsform der Erfindung wobei das innere Salz und die Protease, die den Tieren verabreicht werden sollen, in Form einer Tiernahrung vorliegt, umfasst die vorliegende Erfindung weiterhin die Verwendung von anderen Zusammensetzungen, enthaltend das innere Salz und die Protease, die co-verabreicht werden können in irgendeiner gewünschten Zusammensetzung, einschließlich irgendwelchen Vakzinen, Nahrungsergänzungsmitteln oder Medikamenten.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

[0094] Das folgende Beispiel zeigt die Wirkungen wenn ein erfindungsgemäßer Nahrungszusatzstoff in die Nahrung bei gesunden Tieren enthalten ist, genauso wie die Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer Eimeria-Infektion.

#### (a) Allgemeines Verfahren

[0095] 96 weibliche Masthähnchen (Ross 208) wurden in vier getrennte Gruppen á 24 Tiere geteilt. Die Futterbehandlung wurde am Tag 0 gestartet und das Geflügel wurden einer Eimeria maxima Provokation am Tag 14 unterzogen. Diese Provokation wurde durchgeführt durch Impfen von E. acervulina und E. maxima Oozysten in den Kropf der Hühner in ein 2 ml Volumen Leitungswasser. Die Dosis pro Vogel war 100.000 Oozysten E. acervulina und 50.000 Oozysten E. maxima. Diese zwei Eimeria Arten sind räumlich voneinander im Darm getrennt: E. acervulina infiziert den Zwölffingerdarm und den vorderen Dünndarm, während E. Maxima den Mittel-Dünndarmbereich bevorzugt: vom distalen Dünndarm bis zum mittleren Ileum. Das Geflügel wurden in den Käfigen in den Tagen 0 bis 14 gehalten und in offenen Laufställen mit einem Streu aus Holzspänen zwischen den Tagen 14 bis 21.

[0096] Die den Vögeln bereitgestellte Nahrung war auf Korn-Soja-Basis ohne Coccidiostate. Die Nahrung war in kleine bröckelige Pellets kaltgepresst und hatte einen Durchmesser von ca. 5 mm. Startnahrung wurde von den Tagen 0 bis 14 verwendet und Endnahrung an den Tagen 14 bis 21. Die Zusatzstoffe wurden auf die Nahrungspellets wenn möglich mit Hilfe einer wässrigen Lösung aus Betain (mit einer Dosis von 1 g/kg Nahrung) und einer wässrigen Lösung von AVIZYME® 1510, das ca. 300 U/g Xylanase, 4.000 U/g Protease und 400 U/g  $\alpha$ -Amylase umfasst, erhältlich von Finnfeeds Internation, mit einer Dosis von 1 g/kg Nahrung aufgesprüht.

[0097] Die verwendeten Nahrungszusammensetzungen waren wie folgt:

#### Kornsojanahrung

Inhaltsstoffe	Startnahrung	Endnahrung
Mais	60,81 %	61,09 %
Fischmehl 65 fett	0,50 %	0,50 %
Sojabohnenmehl 48	33,38 %	30,18 %
Sojaöl	1,09 %	4,18 %
Salz	0,39 %	0,32 %
Natriumbicarbonat	0,01 %	0,00 %
D L Methionin	0,18 %	0,10 %
Kalkstein	1,11 %	1,17 %
Dicalciumphosphat	1,53 %	1,46 %
Vitamin + Mineralmix	1,00 %	1,00 %
<b>Gesamt</b>	<b>100,00 %</b>	<b>100,00 %</b>

[0098] Die Nährstoffzusammensetzung dieser Nahrung war wie folgt:

Nährstoff	Startnahrung	Endnahrung
Rohprotein %	21,5	20
Geflügel M E kcal/kg	2975	3175
Schwein D E Kcal	3377,25	3500,69
Calcium %	0,9	0,9
Phos %	0,7	0,67
Zur Verfügung stehendes Phos %	0,42	0,4
Fett %	3,92	6,85
Faser %	2,59	2,49
Met %	0,52	0,42
Cys %	0,36	0,34
Met + Cys %	0,88	0,76
Lys %	1,17	1,07
His %	0,58	0,54
Tryp %	0,25	0,23
Thr %	0,83	0,77
Arg %	1,44	1,33
Iso %	0,92	0,85
Leu %	1,9	1,79
Phe %	1,06	0,98
Tyr %	0,79	0,73

Val %	1,01	0,94
Gly %	0,89	0,83
Phe + Tyr %	1,84	1,72
Na %	0,18	0,15
Cl %	0,29	0,24
K %	0,92	0,85
Linolsäure %	1,64	2,86
Na + K-Cl (meq/kg)	232,46	214,64
D U A (meq/kg)	439,53	436,23
Magnesium %	0,2	0,18

## (b) Ergebnisse

[0099] Das Gewicht der Tiere wurde kurz vor der Eimeria maxima Provokation nach 14 Tagen gemessen. Tabelle 1 zeigt, dass die Verwendung einer Kombination von Betain und Protease zu einer erhöhten Gewichtszunahme im Vergleich zu der individuellen Zugabe dieser Verbindungen zur Nahrung führte.

Tabelle 1

Gruppe	Ernährung	Durchschnittliches Gewicht (g)
A	Kontrolle (nicht versetzte Nahrung)	422
B	Betain versetzte Nahrung (Vergleich)	418
C	Protease versetzte Nahrung (Vergleich)	431
D	Betain und Protease versetzte Nahrung (erfindungsgemäß)	442

[0100] Die Ergebnisse der Tabelle 1 sind graphisch in der **Fig. 1** dargestellt.

[0101] Das Gewicht der Vögel wurde wieder am Tag 21 aufgezeichnet, d. h. nach einem Zeitraum von 7 Tagen nach Eimeria Provokation. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Eine verbesserte Gewichtszunahme für die Gruppe D wurde im Vergleich zu den Gruppen B und C, bei denen die Nahrung entweder mit Betain oder Protease versetzt wurde, beobachtet. Wieder führte eine Kombination dieser beiden Komponenten zu einer Verbesserung, die größer ist, als die Summe der Wirkung der einzelnen Komponenten.

Tabelle 2

Gruppe (Ernährung wie in Tabelle 1)	Durchschnittsgewicht (g)
A	651
B	644
C	665
D	690

[0102] Die Ergebnisse der Tabelle 2 sind graphisch in der **Fig. 2** dargestellt.

Beispiel 2

[0103] Die Aktivität einer Kombination aus Betain und Protease wie in Beispiel 1 verwendet, auf Clostridium perfringens Infektion wurde in diesem Beispiel untersucht. Die verwendete Nahrung war die Endnahrung wie in Beispiel 1 beschrieben.

#### (a) Allgemeines Verfahren

[0104] 12 Hühner, die jeweils 21 Tage alt waren, wurden in 3 getrennte Gruppen, E, F und G á 4 Tiere geteilt. Die Gruppe E wurde einer Provokation mit Eimeria maxima ausgesetzt, die Gruppe F einer Provokation mit Clostridium perfringens und die Gruppe G einer gleichzeitigen Doppelprovokation mit Eimeria und Clostridium perfringens. Das C. perfringens  $\alpha$ -Toxin Gen wurde aus der gesamtmikrobiellen DNA wie folgt nachgewiesen: die gesamte mikrobielle DNA des Zökums wurde einer PCR mit Primern, die entsprechend der bekannten Nukleotidsequenz des C. perfringens  $\alpha$ -Toxin Gens entwickelt wurden, unterworfen. Die Sequenz der  $\alpha$ -Toxinprimer und die Bedingungen zur Durchführung der PCR-Reaktion sind beschrieben von Songer und de Meer in Am. J. Vet. Res 1997 Juli; 58(7), Seiten 702-705.

#### (b) Ergebnisse

[0105] Die intensive Bande in Spur **3** des in **Fig. 3** gezeigten Gels zeigt das Vorhandensein des  $\alpha$ -Toxin Gens von endogenem C. perfringens in dem Tier an. Die Abwesenheit einer solchen Bande in den Spuren **2** und **4** zeigt, dass die Eimeria-Provokation eine essentielle Vorbedingung zum Auftreten einer C. perfringens-Infektion war. Ohne an die Theorie gebunden zu sein wird angenommen, dass die Eimeria-Provokation das normale Niveau an Protease im Darm reduziert, dies verringert dann die Nährstoffaufnahme in den oberen Bereichen des Darms und führt zu erhöhtem Proteinniveau (und somit verbesserten Wachstumsbedingungen für C. perfringens) im Ileum. Ein weiterer Aspekt, der signifikant sein kann, ist die Wirkung der Eimeria-Provokation auf

das Immunsystem des Wirtstieres. Es ist wahrscheinlich, dass die Immunantwort auf eine *C. perfringens*-Provokation geschwächt ist, wenn das Immunsystem bereits mit einer *Eimeria*-Provokation beschäftigt ist. [0106] Ein Vergleich der Spuren **6** und **7** in **Fig. 3** zeigt, dass die Bande, die das *C. perfringens*  $\alpha$ -Toxin Gen anzeigt, nur bei der Behandlung mit Protease alleine (Spur **6**), aber nicht bei der kombinierten Verwendung von Betain und Protease (Spur **7**) beobachtet werden kann. Es ist weiterhin allgemeines Wissen, dass Betain selbst nicht gegenüber einer *C. perfringens*-Provokation wirksam ist. Somit kann geschlossen werden, dass die Kombination von Betain und Protease gegen eine Infektion mit *C. perfringens* wirksam ist, während die Verwendung von entweder Protease oder Betain alleine nicht zu dem Ergebnis führt, dass die Clostridium-Infektion wirksam behandelt werden kann.

### Patentansprüche

1. Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Kokzidiose.
2. Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Behandlung einer *Eimeria*-Infektion bei einem Tier.
3. Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Herstellung eines Futtermittelzusatzstoffs zur Förderung der Gewichtszunahme in einem mit *Eimeria* infizierten Tier.
4. Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer bakteriellen Infektion, die durch Salmonellen, *Campylobacter*, *E. coli* oder *Listeria* hervorgerufen wird.
5. Verwendung einer Protease und eines inneren Salzes einer quaternären Aminocarbonsäure zur Behandlung oder Prophylaxe von nekrotischer Enteritis, die unter anderem durch *Clostridium perfringens*-Infektion hervorgerufen wird.
6. Verwendung gemäss mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das innere Salz ein Betain ist.
7. Verwendung gemäss mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Mittel ferner eine Xylanase umfasst.
8. Verwendung gemäss mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Mittel ferner eine  $\alpha$ -Amylase umfasst.
9. Verwendung gemäss mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Mittel in Form eines Tierfuttermittels vorliegt.
10. Verwendung gemäss Anspruch 9, worin das Futtermittel 0,01–20 g des inneren Salzes pro kg Futtermittel umfasst.
11. Verwendung gemäss Anspruch 9 oder 10, worin die Menge an in dem Futtermittel vorhandener Protease 100–100.000 U Proteaseaktivität pro kg Futtermittel entspricht.
12. Verwendung gemäss mindestens einem der Ansprüche 9 bis 11, soweit auf Anspruch 7 zurückbezogen, worin die Menge an in dem Futtermittel vorhandener Xylanase einer Xylanaseaktivität von 100–100.000 U pro kg Futtermittel entspricht.
13. Verwendung gemäss mindestens einem der Ansprüche 9 bis 12, soweit auf Anspruch 8 zurückbezogen, worin die Menge an in dem Futtermittel vorhandener  $\alpha$ -Amylase einer  $\alpha$ -Amylaseaktivität von 100–100.000 U pro kg Futtermittel entspricht.
14. Zusatzstoff für ein Tierfuttermittel, das eine Protease, eine Xylanase und ein inneres Salz einer quaternären Aminocarbonsäure umfasst.
15. Zusatzstoff gemäss Anspruch 14, worin das innere Salz Betain ist.

## DE 600 04 879 T2 2004.06.03

16. Zusatzstoff für ein Tierfuttermittel gemäss Anspruch 14 oder 15, das ferner eine  $\alpha$ -Amylase umfasst.

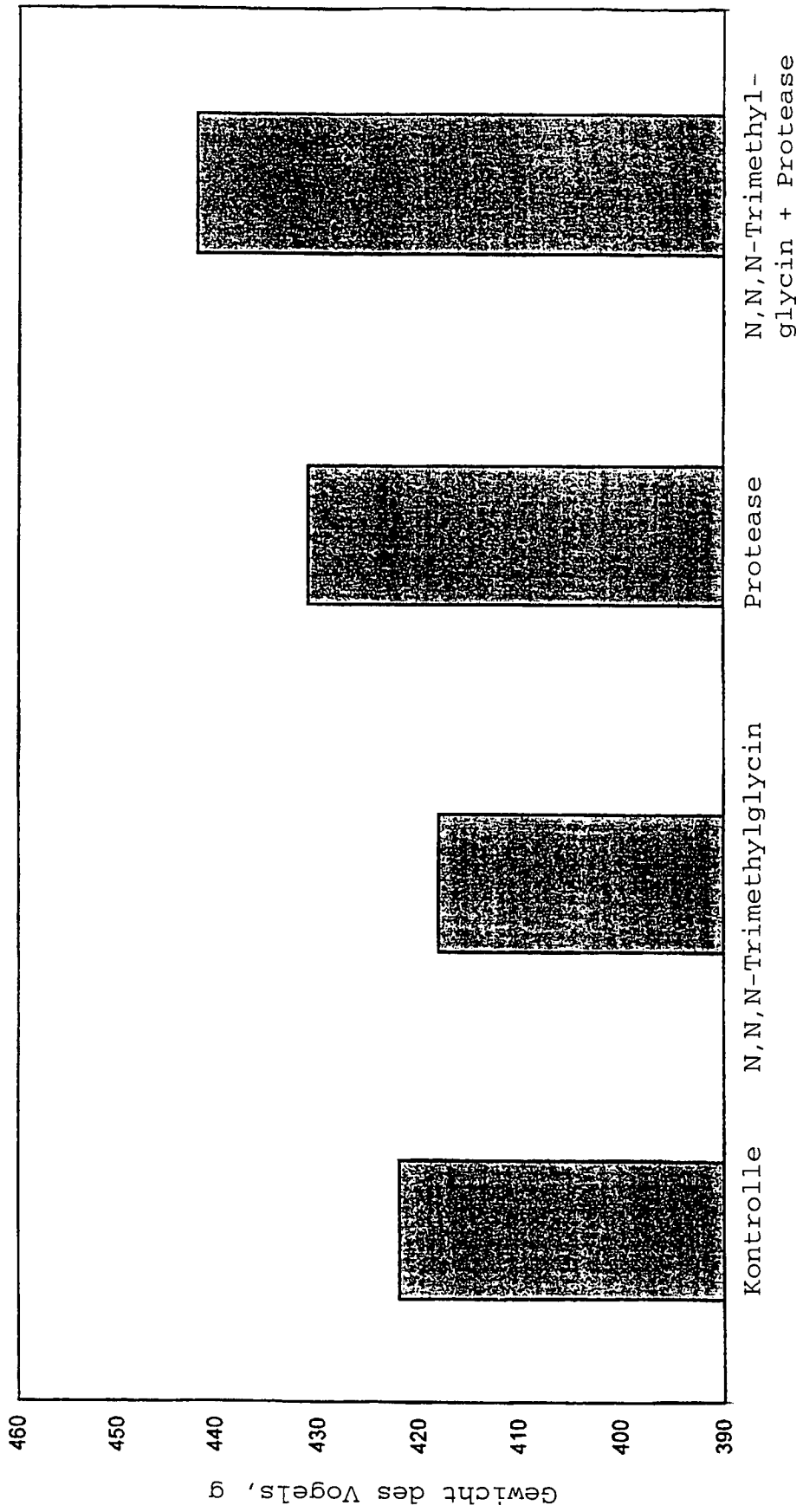
17. Tierfuttermittel, das einen Zusatzstoff gemäss mindestens einem der Ansprüche 14 bis 16 und mindestens 25 Gew.-% Getreide umfasst.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

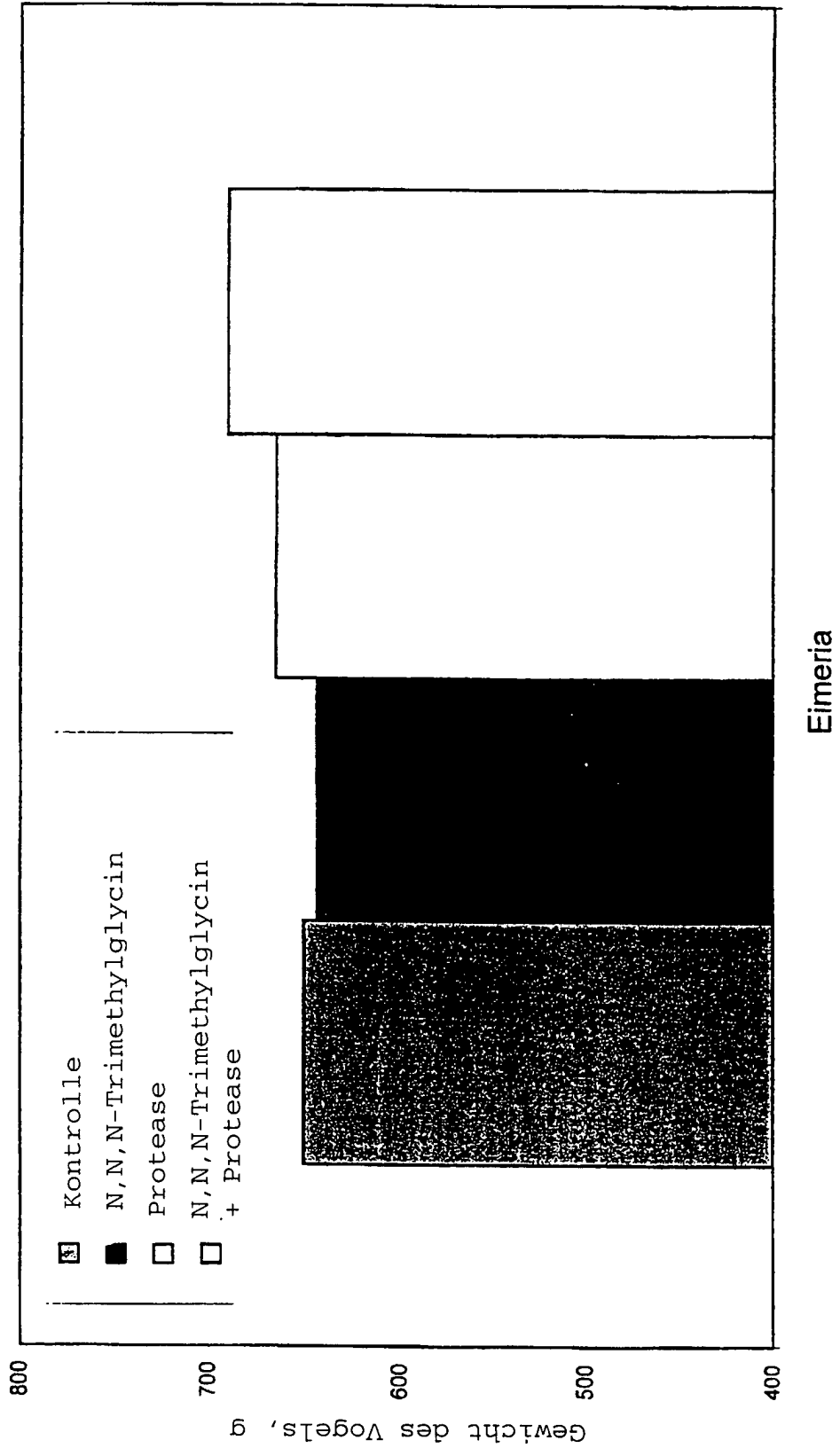
Fig. 1

Keine Eimeria-Provokation: Gewicht des Vogels am Tag 14





**Fig. 2** Eimeria-Provokation: Gewicht des Vogels am Tag 21



**Fig. 3**

Nachweis des *C. perfringens* Toxingens im Ileum

