

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

87286

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 20.02.70 (P. 138920)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 10.05.73

Opis patentowy opublikowano: 30.04.1977

MKP C12d 13/10

Int. Cl.² C12D 13/10

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Michel Hooreman, Paryż (Francja)

Sposób wytwarzania nowych enzymów proteolitycznych

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych enzymów proteolitycznych, powodujących in vivo korzystniejszą lepkość wydzieliny śluzowej jelit, oskrzeli i szyjki macicy.

Stały rozwój intensywnej hodowli zwierząt w krajach uprzemysłowionych i poważny brak białek zwierzęcych w krajach rozwijających się powoduje coraz większą konieczność badań w celu zwiększenia szybkości wzrostu zwierząt i zmniejszenia wskaźnika spożycia paszy.

Dotychczas badano wpływ dodatku do mieszanin paszowych dla zwierząt różnych pospolitych entymów (proteolitycznych, lipolitycznych i amylolitycznych) ułatwiających trawienie głównych składników tych pasz (białek, tłuszczów i cukrów). Przypuszczano, że te enzymy egzogenne dodane w celu uzupełnienia enzymów endogennych będą ułatwiały trawienie in vivo i tym samym wzrost zwierząt. Badania te nie doprowadziły do uzyskania wyników praktycznie ważnych: polepszenie lekkostrawności i zmiana szybkości wzrostu oraz wskaźnika spożycia, które czasami stwierdzono, okazały się słabe i zmienne bez względu na wartość dodanych enzymów.

Błona śluzowa jelit, nietrwała jak wszystkie błony śluzowe, ochraniana jest przed działaniem środowiska zewnętrznego przez warstwę lepkiej cieczy: wydzieliny śluzowej jelit. Lepkość tej wydzieliny śluzowej wiąże się z obecnością makromolekuł mucyny i mukopolisacharydów, które połączone są pomiędzy sobą mostkami białkowymi tworzącymi zwartą strukturę siateczkową. Wydzielina śluzowa jelit tworzy w ten sposób rodzaj bariery ochronnej pomiędzy błoną śluzową i masą rozdrobnionego podczas trawienia pokarmu. Ta bariera ochronia ściankę jelita przed bezpośrednim kontaktem z dużymi cząsteczkami enzymów endogennych (trypsyny, chymotrypsyny), które przeprowadzają trawienie pokarmu lecz mogą następnie atakować błony śluzowe. Ta bariera powinna działać wybiórczo przepuszczając poprzez ściankę jelita małe cząsteczki pochodzące ze strawionego pokarmu w celu włączenia ich w obieg krwi.

Jeżeli wydzielina śluzowa jelit jest nadmiernie lepka hamuje przenikanie do krwi cząsteczek pochodzących z pokarmu, jeżeli wykazuje ona niedostateczną lepkość przestaje spełniać rolę czynnika ochraniającego błonę śluzową. Można przypuszczać, że pomiędzy tymi dwoma stanami najkorzystniejsza lepkość ustala się bardzo rzadko.

Pospolite enzymy proteolityczne uprzednio już wypróbowane w żywieniu zwierząt lecz bez sukcesów, wykazały wpływ na lepkość wydzieliny śluzowej albo niedostateczną albo nadmierną. W pierwszym przypadku szybkość absorpcji przez ściankę jelita pozostawała bez zmian. W drugim przypadku nadmierne działanie enzymów jak inne działanie drażniące, powoduje zwiększenie szybkości gromadzenia się wydzieliny śluzowej w gruczołach śluzowych i niepożądane nadmierne wydzielanie jej na zewnątrz.

Istnienie enzymów proteolitycznych zdolnych do powodowania korzystniejszej lepkości wydzieliny śluzowej jelit, to jest zdolnych do znacznej redukcji tej lepkości bez obawy nadmiernego wydzielania nie było oczywiste a priori. Podczas długiego przechodzenia przez jelita, pokarm jest zawsze całkowicie absorbowany i jak wykazały doświadczenia nie pozostaje w kale. Jednak, ta absorpcja nie jest dostatecznym kryterium korzystnego zużycia pokarmu. Można przypuszczać, że odpowiednia absorpcja powodowała jednocześnie dostateczne stężenie we krwi wszystkich czynników syntezy anabolicznej. Lecz tylko doświadczenie mogło potwierdzić prawo, które nie było oczywiste a priori: dla szybkości wzrostu lepiej jest otrzymać we krwi maksymalne stężenie cząsteczek strawionego pokarmu w stosunkowo krótkim czasie, niż stężenie średnie podczas bardzo długiego czasu jeżeli w obydwu przypadkach całkowita ilość przechodzącego do krwi pokarmu jest taka sama.

Celem wynalazku jest taki sposób wytwarzania produktów enzymatycznych aby produkty te optymalizowały lepkość śluzu w żywym organizmie, w konsekwencji zwiększały prędkość pochłonięcia pokarmu poddanego trawieniu.

Stwierdzono, że enzymy proteolityczne wytwarzane z nowych szczepów mikroorganizmów, a mianowicie szczepu 1998 i 2019 *Streptomyces fradiae* złożonych w Narodowym Muzeum Przyrodniczym w Paryżu w dn. 16.01.1969 i 12.03.1969 spełniają to zadanie.

Szczepy *Streptomyces fradiae* nr 1998 i 2019 charakteryzują się następującymi cechami morfologicznymi i fizjologicznymi:

1. Morfologia. Torebki zarodnikowe rozgałęzione zrosnięte, proste lub falujące. Formy spiralne obserwowane tylko na niektórych typach pożywek, wyjątek stanowi szczep 1998 wykazujący formy silnie skręcone. Nitki grzybni wegetatywnej mają średnicę rzędu $0,5\ \mu$. Zarodniki powstają przez podział włókien powietrznych grzybni na cylindryczne fragmenty, które osiągnąwszy dojrzałość przyjmują kształt owalny. Wymiary ich są rzędu od $0,5$ do $0,7\ \mu$ na $1,25$ do $1,50\ \mu$.

2. Właściwości fizjologiczne.

a) Właściwości proteolityczne *Streptomyces fradiae* określone zostały na pożywce kazeinowej na mleku, żelatynie, L-tyrcynie. Stwierdzono, że szczep 2019 rozwija się punktowo – wytwarzanie zarodników jest szybkie z jednoczesnym bardzo wyraźnym różowo-lila zabarwieniem. Brak zabarwienia czarnego, spód kolonii jasno pomarańczowo-żółty. Szczep 1998 rozwija się wolniej, grzybnia powietrzna różowo-lila, spód pomarańczowy, brak barwnika czarnego.

b) Redukcja azotanów. Nie obserwowano zauważalnej redukcji azotanów do azotynów.

c) Skrobia. Rozwój organizmu badanego na plasterkach kartofli jest ograniczony, wytwarzanie zarodników pojawia się nie zawsze; natomiast na płatkach owsianych rozwój obydwóch szczepów przebiega bardzo dobrze. W obydwóch przypadkach obserwowana była wyraźna czynność diastatyczna.

d) Produkcja siarkowodoru. Nie występuje.

Sposób wytwarzania nowych enzymów proteolitycznych według wynalazku, przeznaczonych do optymalizacji lepkości śluzu jelitowego, oskrzelowego i szyjnego polega na tym, że szczep 1998 lub 2019 *Streptomyces fradiae* poddaje się hodowli w znany sposób, to znaczy na pożywce zawierającej źródło azotu i soli mineralnych, przy napowietrzaniu środowiska hodowlanego tak długo dopóki końcowe miano środowiska fermentacyjnego nie osiągnie 3000 j. Ansona na 1 ml, po czym otrzymane produkty koncentruje się i oczyszcza znanymi metodami.

Jako pożywkę wykorzystuje się środowisko ciekłe, zawierające: 30 g/l mąki sojowej, 30 g/l glukozy, 0,8 g/l fosforanu dwupotasowego, 10 g/l węgla wapniowego.

Fermentację prowadzi się w temperaturze 28°C , przy $\text{pH} = 7,0$ i przy doprowadzaniu 0,3 objętości powietrza na 1 objętość pożywki w minutę. Okres fermentacji wynosi 60–84 godzin.

Jednostką Ansona (lub w skrócie U.A.) jest ilość enzymu, która przy inkubacji w ciągu 10 minut w temperaturze 25°C i $\text{pH} 7,5$ w obecności zdenaturowanej hemoglobiny uwalnia ekwiwalent $1\ \mu\text{g}$ tyrozyny oznaczanej metodą absorpcji na fotometrze przy długości fali $2800\ \mu$ w przesączu nieoczyszczonym kwasem tróchlorooctowym.

W wyniku fermentacji otrzymuje się produkty enzymatyczne obniżające lepkość śluzu jelitowego w granicach od 35 do 65% i jednocześnie niewrażliwe na inhibitory trypsyny.

Produkty enzymatyczne wytwarzane sposobem według wynalazku wywołują w żywym organizmie adekwatną optymalizację śluzu. W porównaniu z fermentami naturalnymi o działaniu optymalizującym trypsynę

i chymotrypsynę – ich działanie optymalizujące jest wyższe. Porównanie z tymi fermentami przeprowadza się w próbce za pomocą testu ograniczonej redukcji lepkości (w skrócie test RMV).

Enzymy wytwarzane sposobem według wynalazku powodujące *in vivo* odpowiednio korzystniejszą lepkość wydzieliny śluzowej jelit były częściowo scharakteryzowane przez porównanie ich działania *in vitro* w obecności wydzieliny śluzowej jelit z działaniem dwu enzymów proteolitycznych: trypsyny i chymotrypsyny. Badania porównawcze przeprowadzono według testu ograniczonej redukcji lepkości (w skrócie test RMV) i ich niewrażliwości na inhibitory trypsyny, te ostatnie badania przeprowadzono *in vivo*.

Redukcja lepkości wydzieliny śluzowej jelit przez enzymy wytwarzane sposobem według wynalazku może być porównana w przybliżeniu $\pm 5\%$ w odniesieniu do lepkości wymienionej wydzieliny śluzowej jelit, na którą nie działały enzymy, pomiędzy wartościami redukcji lepkości przez trypsynę i chymotrypsynę, to jest odpowiednio $60 + 5 = 65\%$ i $40 - 5 = 35\%$ w odniesieniu do lepkości wydzieliny śluzowej jelit, na którą nie działały enzymy, w warunkach opisanych dalej.

Redukcja *in vitro* lepkości wydzieliny śluzowej jelit przez enzymy otrzymane sposobem według wynalazku jest zawarta dokładnie pomiędzy redukcją wywołowaną przez trypsynę i chymotrypsynę (60%–40%).

Wytwarzanie enzymów proteolitycznych sposobem według wynalazku kontrolowane jest testem RMV. Proces fermentacji zostaje zakończony gdy wymagane substancje enzymatyczne dają redukcję lepkości wydzieliny śluzowej jelit rzędu pomiędzy działaniem chymotrypsyny obniżonym o 5% i działaniem trypsyny podwyższonym o 5% (wartości procentowe oznaczane były w stosunku do lepkości wydzieliny śluzowej jelit, na którą nie działały enzymy). Sposób według wynalazku obejmuje także stosowanie metod koniecznych do oczyszczenia otrzymanych preparatów, które nie są wrażliwe na inhibitory trypsyny.

Mikroorganizmy stosowane do wytwarzania enzymów wybiera się spośród tych, które dają preparaty enzymatyczne odpowiadające 2 warunkom: test RMV dodatni i brak wrażliwości na inhibitory trypsyny. Spośród mikroorganizmów odpowiednich do stosowania w sposobie według wynalazku interesujące są organizmy z rodzaju *Streptomyces* szczególnie gatunek *Streptomyces fradiae*.

Test RMV przeprowadza się w sposób następujący:

a) Przygotowanie preparatu enzymatycznego do badań. Fermentację przeprowadza się klasycznym sposobem stosując mikroorganizm wytwarzający dużą ilość mieszaniny enzymów proteolitycznych. Po zakończeniu fermentacji płyn sący się, zagęszcza, liofilizuje lub suszy rozpyłowo; w ten sposób otrzymuje się surowy preparat enzymatyczny; korzystniej po przesączeniu i zagęszczeniu można otrzymać preparat przez strącenie siarczanem amonowym i wysuszenie w próżni. Można też preparat poddać chromatografii lub elektroforezie. Takie preparaty oznaczone klasyczną metodą Anson'a zawierają zależnie od sposobu obróbki 100, 1000, 10000, 50000 jednostek na 1 mg.

Jako substrat do pomiaru lepkości stosuje się wydzielinę śluzową jelit cielęcia lub świni. Natychmiast po uboju zwierzęcia będącego na diecie od 24 godzin pobiera się od części wychodzącej z żołądka 3 kolejne odcinki jelita, około 1 metra każdy. Przewiązuje się koniec jelita i poddaje się je słabemu ciśnieniu w wyniku czego przez drugi koniec wyciska się powierzchnię wydzieliny śluzowej i odrzuca, następnie jelito poddaje się silnemu ciśnieniu lub oskrobuje ściankę wewnętrzną jelita uprzednio rozciągniętego pobierając wydzielinę śluzową głęboką, oddziela się substancje rozpuszczalne przez splukiwanie 3 objętościami wody i wiruje. Przeciętnie przygotowuje się 50 ml wydzieliny śluzowej z jednego zwierzęcia i można ją przechowywać w ciągu wielu dni w temperaturze 20°C lub używać bezpośrednio do badań lepkości.

Do tych badań stosuje się mikrowiskozymetr Brookfield'a pozwalający na pracę z 1 g nierozpuszczalnej wydzieliny śluzowej. Szybkość ruchomego walca wynosi na ogół 12 obrotów na minutę i temperatura 37°C. Skala stopni od 0 do 100 pozwala oznaczyć lepkość względną przez bezpośredni odczyt. Strzałkę wiskozymetru ustawia się na 100 z samą wydzieliną śluzową i następnie dodaje 0,1 ml roztworu buforowego o wartości pH 7,5 zawierającego badany preparat enzymatyczny. Jeżeli ten preparat jest aktywny, lepkość zmniejsza się szybko i można wykreślić krzywą redukcji. Trypsyna i chymotrypsyna stosowane są w postaci preparatów o wysokiej czystości odpowiednio 16000 i 20000 j/mg. Powodują one silną redukcję lepkości ustającą po 30 minutach, tak że czas trwania pomiaru ustalono na 30 minut. Enzymy te w stężeniu 50 jednostek na gram wydzieliny śluzowej powodują redukcję lepkości o 20%. W stężeniu 5 razy większym 250 j/g albo jeden albo drugi enzym powoduje redukcję lepkości odpowiednio 60% i 40%. Wydzielina śluzowa jelit cielęcia lub świni, zwierząt różniących się od siebie, może dawać wyniki w zależności od użytej próby wydzieliny śluzowej. W przypadku uzyskania wyników o zbyt odległych wartościach od uprzednio otrzymanych można eliminować próbki lub poddać frakcjonowanemu wytrąceniu i ponownie zawiesić w celu odnalezienia przybliżonych wartości.

Z tego rodzaju próbką wydzieliny śluzowej oznacza się redukcję lepkości powodowaną przez 250 jednostek badanej substancji enzymatycznej na 1 g wydzieliny śluzowej. Jeżeli wartość redukcji zawarta jest pomiędzy 40% i 60% i bardziej ogólnie pomiędzy 35% i 65% preparat enzymatyczny zalicza się jako odpowiedni według testu RMV i zdolny do powodowania korzystniejszej lepkości wydzieliny śluzowej.

Działanie enzymów na wydzielinę śluzową jest przedstawione na fig. 1; gdzie czas podano w minutach i wartość redukcji w procentach. Ten rysunek przedstawia krzywe otrzymane z trypsyną (krzywa 1) i chymotrypsyną (krzywa 2), z enzymem, który nie jest odpowiedni według testu RMV mianowicie z papainą (krzywa 3), z enzymem, który jest ściśle odpowiedni według testu RMV (enzym *Streptomyces fradiae* cząstka 2, krzywa 4) i z enzymem, który nie jest odpowiedni według testu RMV przez nadmierne działanie (enzym u *Bacillus subtilis*, krzywa 5).

Wynalazek zilustrowano przykładami nie ograniczającymi jego zakresu.

Przykład I. Mikroorganizm *Streptomyces fradiae* – poddał klasycznej fermentacji w temperaturze 28°C przy pH 7,5. Z produktów fermentacji wybrano te, dla których test RMV był dodatni i u których stwierdzono brak wrażliwości na inhibitory trypsyny. Płyn fermentacyjny podzielono na 4 partie, z których w różny sposób przygotowano 5 produktów: A, B, C, D i E.

Produkt A: płyn po fermentacji sący się i zagęszcza w próżni, otrzymuje się surowy płynny produkt 50000 j/ml.

Produkt B: z części produktu A w wyniku suszenia rozpyłowego otrzymuje się stały produkt enzymatyczny o mocy 100 j/mg.

Produkt C: z części produktu A przez wytrącenie siarczanem amonowym i wysuszenie w próżni otrzymuje się częściowo oczyszczony produkt enzymatyczny o mocy około 1000 j/mg.

Produkt D: z części produktu A w wyniku serii wytrąceń siarczanem amonowym i rozpuszczeń w acetonie oraz w wyniku wysuszenia w próżni końcowego produktu otrzymuje się średnio czysty produkt enzymatyczny o mocy 10000 j/mg wykazujący stosunkową jednorodność elektroforetyczną.

Produkt E: z części produktu D w stanie ciekłym w wyniku elektroforezy lub chromatografii na kolumnie, dializy lub liofilizacji oddziela się enzym wysokiej czystości o mocy około 50000 j/mg wykazujący całkowitą jednorodność elektroforetyczną.

Wszystkie te produkty odpowiadały testowi RMV.

Przydatność tych produktów w praktyce opisano w dalszych przykładach.

Przykład II. Badanie wpływu enzymów na zmniejszenie lepkości wydzieliny śluzowej i na wzrost szczurów.

Trzytygodniowe białe szczury – albinosy o ciężarze ciała około 40 g, umieszcza się w klatkach po 5 samców lub 5 samic. Otrzymują one dowolny pokarm jak również wodę do picia; są one ważone oddzielnie 2 razy w tygodniu w ciągu 3 tygodni; średni przyrost dzienny ciężaru ciała jest więc określany przez grupę 10 zwierząt (5 samców i 5 samic). Grupa kontrolna otrzymuje pokarm Mc Collum.

Grupy doświadczalne otrzymują taki sam pokarm uzupełniony enzymami w ilości 100 j/g i 1000 j/g. Przyjmując, że jeden hodowany szczur spożywa dziennie pokarm odpowiadający 1/10 ciężaru jego ciała (10 g pokarmu dziennie na jednego 100 g szczura). Te dawki zawierają odpowiednio 10000 i 100000 jednostek na kg ciężaru ciała na dzień.

Stosowano te enzymy, których działanie scharakteryzowane jest na fig. 1. Oprócz enzymu z S.F. cząstka 2 (S.F. = *Streptomyces fradiae*) powodującego zmniejszenie lepkości wydzieliny śluzowej o 50%, stosuje się enzymy z S.F. cząstka 1 i S.F. cząstka 3, które zmniejszają lepkość o 40% i 60%. Każdy z tych enzymów jest odpowiedni według testu RMV w dość szerokim zakresie ponieważ powoduje obniżenie lepkości od 35% do 65%. Natomiast enzym z S.F. cząstka 2 jest odpowiedni według testu RMV w węższym lecz wystarczającym zakresie. Te 3 enzymy odpowiadają produktowi C i mają moc około 2000 j/mg.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tablicy I.

Tablica I

Wpływ enzymów na zmniejszenie lepkości wydzieliny śluzowej
i na wzrost szczurów

Enzym	Zmniejszenie lepkości	Bez enzymu g/dzień	Wzrost szczurów			
			z 100 j/g paszy		z 1000 j/g paszy	
			g/dzień	%	g/dzień	%
	0	2,85				
Papaina	30		2,85	100	2,85	100
S.F. cząstka 1	40		3,45	121	3,40	119
S.F. cząstka 2	50		4,15	145	4,05	142
S.F. cząstka 3	60		3,25	114	2,95	103
B.S.	80		3,0	105	2,40	84

S.F.: enzym ze *Streptomyces fradiae*

B.S.: enzym z *Bacillus subtilis*

Enzym ze S.F. cząstka 2, którego działanie na wydzielinę śluzową znajduje się pomiędzy działaniem trypsyny i chymotrypsyny (redukcja lepkości: 50% stymuluje szybkość wzrostu szczurów o 40%–45% po zastosowaniu 2 dawek.

W przypadku zastosowania enzymu z S.F. cząstka 1 działanie na wydzielinę śluzową jest porównywalne z działaniem chymotrypsyny (redukcja lepkości 40%). Ta stymulacja jest słabsza i osiąga 20% po zastosowaniu 2 dawek.

W przypadku zastosowania enzymu z S.F. cząstka 3, którego działanie zbliżone jest do działania trypsyny (redukcja lepkości 60%) stymulacja wzrostu jest rzędu 14% po dodaniu słabej dawki, natomiast po zastosowaniu silnej dawki nie zaobserwowano żadnych zmian.

Można stwierdzić, że cząsteczki enzymów z S.F. odpowiednie są według testu RMV w sposób niejednoznaczny i wykazują korzystny lecz nierównomierny wpływ na wzrost szczurów. W przypadku prowadzenia fermentacji niezgodnie ze sposobem według wynalazku otrzymuje się enzymy nieodpowiednie według testu RMV i wykazujące wyraźnie niekorzystny wpływ na wzrost szczurów.

Papaina, która nie jest odpowiednia według testu RMV nie wykazuje wpływu na wzrost szczurów.

Pewien enzym z *Bacillus subtilis* nie jest odpowiedni według testu RMV w nadmiarze, podany w niewielkiej dawce wykazuje korzystny wpływ na wzrost szczurów. Jednak przy podaniu większej dawki wpływ ten jest znikomy. Podczas autopsji stwierdzono, że ściana jelita szczurów po tej silnej dawce wykazuje hipersekreję co wystarczająco tłumaczy zwolnienie tempa wzrostu.

Trypsyna i chymotrypsyna wywołują niewielkie i zmienne zwiększenie szybkości wzrostu szczurów wahające się poniżej 10%. Te enzymy trzustki, które *in vitro* działają na wydzielinę śluzową podobnie jak enzymy z S.F.; *in vivo* wpływają na wzrost szczurów znacznie gorzej. Tę anomalię może tłumaczyć fakt, że trypsyna i chymotrypsyna stosowane w nadmiarze są podatne na blokowanie *in vivo* przez endogenne inhibitory takie jak inhibitor trzustkowy Kunitz'a, natomiast enzym dominujący w cząstkach 1, 2 i 3 otrzymany ze *Streptomyces fradiae* jest praktycznie niewrażliwy na te inhibitory jak i na inhibitory egzogenne takie jak inhibitor sojowy.

Przykład III. Wpływ enzymów proteolitycznych na wzrost szczurów przy karmieniu ich pokarmem bogatym w białka sojowe.

Pokarm ten stosowany zwykle w hodowli kurcząt ma następujący skład: mąka kukurydziana 60%, mąka sojowa 33%, łój 3%, mieszanka mineralna i witaminowa 4%. Doświadczenie jest prowadzone w grupach po 10 szczurów samców, ogólnie w takich samych warunkach jak w doświadczeniach poprzednich.

Grupa kontrolna ma średni przyrost ciężaru ciała 5,25 g/dzień.

Grupa doświadczalna 1 otrzymująca taki sam pokarm uzupełniony enzymem z S.F. cząstka 2 w ilości 1000 j/g (dawka ta odpowiada w przybliżeniu 100000 j na kg ciężaru ciała dziennie) wykazuje taki sam przyrost dzienny jak grupa kontrolna.

Grupa doświadczalna 2 otrzymująca taki sam pokarm, lecz również wodę do picia z rozpuszczonym enzymem S.F. cząstka 2 w ilości 500 j/ml (dawka ta odpowiada w przybliżeniu 100000 j na kg ciężaru ciała dziennie) wykazuje średni przyrost 7,3 g/dzień, co odpowiada zwiększeniu ciężaru ciała o 39%.

Niepowodzenie obserwowane w grupie doświadczalnej 1 nie jest spowodowane obecnością w soi inhibitora Northrop, ponieważ jest on uprzednio zniszczony podczas obróbki termicznej dokonywanej zwykle przed podaniem substratu. To niepowodzenie wiąże się raczej z faktem, że enzym wykazuje powinowactwo do białek sojowych, które dodawane do pokarmu w zwiększonym stężeniu mogą wiązać cały enzym, co z kolei eliminuje jego działanie na białka wydzieliny śluzowej, której lepkość nie ulega redukcji. W przypadku dodania enzymu do wody pitnej zamiast do pokarmu problem ten będzie częściowo wyeliminowany i stąd uzyskuje się sukces w grupie doświadczalnej 2. Lepiej jest więc podawać enzym w wodzie pitnej. Wyniki doświadczeń wykazują, że stabilność enzymu w roztworze jest dobra, co pozwala na zastosowanie tej metody w hodowli przemysłowej.

Przykład IV. Wpływ enzymów proteolitycznych na wzrost szybkości wchłaniania pokarmu przez ściany jelitowe.

Operację przeprowadza się na 5 szczurach będących na diecie w ciągu 24 godzin, ważących około 150 g, znieczulonych uretanem. Po otwarciu jamy brzusznej izoluje się około 10 cm jelita cienkiego i łączy koniec sondą ze środowiskiem zewnętrznym, po przemyciu jelita wprowadza się 0,4 ml roztworu hydrolizatu kazeiny zawierającego 2,5 mg azotu i pozostawia w jelicie w ciągu 10 minut, po zebraniu roztworu kazeiny wprowadza się w roztwór płukanki, który następnie także odciąga się.

Na tym samym szczurze przeprowadzono identyczne doświadczenie wprowadzając jednak uprzednio 0,05 ml roztworu zawierającego 0,5 mg/ml enzymu S.F. cząstka 2, co odpowiada około 50 jednostek.

Stwierdzono, że w próbkach kontrolnych bez enzymu procent absorbowanego azotu jest zmienny u różnych zwierząt i wynosi średnio 5%. W próbach doświadczalnych procent ten jest mniej zmienny i bardziej zwiększony osiągając średnią wartość 17%.

Stosując tę samą technikę można badać szybkość wchłaniania innych pokarmów i ewentualne zwiększenie wchłaniania pod wpływem enzymu. Stwierdzono, że zjawisko to zachodzi w większym stopniu przy wchłanianiu białek niż cukrów czy tłuszczów. Zwiększenie szybkości wzrostu pod wpływem enzymu znajduje odbicie raczej w obrazie mięśni niż w tworzeniu się substancji zapasowych. Można więc powiedzieć, że wzrost zwierzęcia należy rozpatrywać jako korzyść jakościową i ilościową.

Stosując tę samą technikę można również badać szybkość wchłaniania lekarstw, których przenikanie przez ściany jelit może być lub nie być uzależnione od specyficznych przenośników. Stwierdzono, że szybkość wchłaniania lekarstw w przypadku zastosowania enzymu zwiększa się lecz w sposób nierównomierny.

Przykład V. Wpływ enzymów proteolitycznych na przyrost wagi kurcząt.— Kurczęta hodowane są na ziemi. Kurczęta — samce gatunku Arbor-Acres najpierw hodowane w grupie otrzymują taki sam pokarm. Kurczęta 12-dniowe rozdziela się na 4 grupy po 25 szt. o takim samym średnim ciężarze ciała (124 g) i o takim samym odchyleniu standardowym (3,28)).

Grupa kontrolna 1 otrzymuje pokarm, którego podstawą jest kukurydza i soja o małym stężeniu białka (16%). W 46 dniu doświadczenia średni ciężar ciała 58-dniowych kurcząt wynosi 1430 g a wskaźnik spożycia (stosunek ciężaru pokarmu spożytego do ciężaru ciała zwierząt) wynosi 2,30.

Grupa doświadczalna 1 otrzymuje taki sam pokarm uzupełniony 4 g/kg substancji B powyżej określonej o mocy 100 j/mg; dawka enzymu wynosi w ten sposób 400 j/kg pokarmu co odpowiada w przybliżeniu 40000 j/kg ciężaru ciała na dzień. Pod koniec doświadczenia średni ciężar wynosi 1553 (–8%) a wskaźnik spożycia 2,15 (–7%).

Grupa kontrolna 2, otrzymuje pokarm, którego podstawą jest kukurydza i soja, zawierający normalne stężenie białka (22%), pod koniec doświadczenia średni ciężar ciała wynosi 1676 g a wskaźnik spożycia 2,09.

Grupa doświadczalna 2 otrzymuje taki sam pokarm uzupełniony dawką 400 j/kg pokarmu. Pod koniec doświadczenia średni ciężar wynosi 1772 g (–6%) a wskaźnik spożycia 1,98 (–5%).

Przykład VI. Wpływ enzymów proteolitycznych na przyrost wagi kurcząt hodowanych w inkubatorach z oświetleniem.

Doświadczenie przeprowadzone jest w 2 grupach około 600 kurcząt gatunku Vavguard-Garrison w klatkach. Grupa kontrolna otrzymuje pokarm handlowy, którego podstawą jest soja i kukurydza, zawierający 21% białka i 5% tłuszczu. Pokarm ten zawiera 8 mg penicyliny prokainowej i 25 mg/kg tetracykliny. Grupa doświadczalna otrzymuje taki sam pokarm uzupełniony 400 mg/kg produktu C określonego powyżej; dawka enzymu wynosi w ten sposób 800 j/kg pokarmu, co odpowiada w przybliżeniu 8000 j/kg ciężaru ciała dziennie.

W 30 dniu doświadczenia kurczęta wykazywały w dwu grupach pozornie taki sam rozwój, lecz pojedyncze kurczę spożywało średnio 1080 g w grupie kontrolnej a w grupie doświadczalnej tylko 903 g, co stanowi około 16% oszczędności pokarmu.

W 40 dniu wybuchła w całej hodowli epidemia, którą o wiele lepiej przetrwała grupa doświadczalna. W 60 dniu doświadczenia śmiertelność w grupie kontrolnej wynosiła 5% a w grupie doświadczalnej tylko 1,6%. Średni ciężar ciała wynosi 1346 g i 1319 g. To niewielkie wahanie ciężaru ciała w grupie doświadczalnej tłumaczy fakt, że w grupie tej zwierzęta o słabszej budowie przeżyły epidemię i zawdzięczają to obecności enzymu w pokarmie. Wskaźniki spożycia wynoszą 2,8 i 2,68 co stanowi około 6,5% oszczędności pokarmu w grupie doświadczalnej.

Rachunek ekonomiczny wyraźnie wskazuje, że zysk z 1000 kurcząt wynosi odpowiednio 64 F i 260 F nie wliczając kosztu enzymu.

Doświadczenie kontrolne: na początku głównego doświadczenia z każdej grupy hodowlanej na ziemi przeniesiono po 25 kurcząt do odizolowanego pomieszczenia zapewniając w ten sposób zwierzętom jak najlepsze warunki sanitarne, śmiertelność w tych grupach jest znikoma. Średni ciężar ciała w grupie kontrolnej wynosi 1603 g a w grupie doświadczalnej 1746 g (+9%) wskaźniki spożycia równają się odpowiednio 2,68 i 2,41 (–10%).

Przykład VII. Wpływ enzymów wytwarzanych w/g wynalazku na śmiertelność i aktywność plemników.

Postępowano jak w przykładzie VI, z tą różnicą, że doświadczenie z kurczętami przeprowadzono raz w lecie podczas dużych upałów, drugi raz w jesieni w bardziej ustabilizowanych warunkach klimatycznych.

W końcu doświadczenia w 60 dniu śmiertelność w grupie kontrolnej wynosi 7,9% i 4,8% w grupie doświadczalnej.

Średnie ciężary wynoszą szacunkowo 1338 g i 1356 g.

Wskaźniki spożycia równają się odpowiednio 2,73 i 2,38, co stanowi około 12,4% oszczędności pokarmu w grupie doświadczalnej.

Rachunek ekonomiczny wyraźnie wskazuje, że zysk z 1000 kurcząt wynosi 77 F i 469 F nie wliczając kosztów enzymu.

Doświadczenia na kurczętach były przeprowadzone przed wysunięciem założeń o wiązaniu enzymu przez białka sojowe i przed podjęciem zapobiegawczych czynności polegających na dodawaniu enzymu do wody pitnej tak jak w przykładzie II. Dodanie enzymu do wody pitnej zamiast do pokarmu, wpływa korzystnie na wyniki a szczególnie na stymulację wzrostu, co pokrywa się z uzyskanymi uprzednio wynikami w przykładzie II (+39%).

Doświadczenia na cielętach. Oprócz działania podstawowego na wydzielinę śluzową jelit, substancja enzymatyczna wytworzona sposobem według wynalazku może wywierać także duży wpływ na sam pokarm. Pomiedzy momentem, gdy mleko przeznaczone dla cieląt jest umieszczone w temperaturze 37°C i momentem gdy jest ono spożyte przez cielęta, upływa często około 1/2 godziny. Okres ten jest wystarczający do częściowej degradacji białka mleka w środowisku płynnym w temperaturze 37°C przez substancję enzymatyczną, co może w pewnym stopniu przyczynić się do ogólnej poprawy wzrostu cieląt.

Przykłady VI i VII wskazują, że w hodowli przemysłowej śmiertelność jest wyraźnie zmniejszona w grupie doświadczalnej. Fakt ten można różnie interpretować.

Wiadomo, że mikroorganizmy patogenne posiadają czasem grubą otoczkę śluzową a kokcydy lub inne pasożyty mogą przyczyniać się do tworzenia zagłębień w jelitach, w których umiejscowiają się. Gruba warstwa ochronna zbyt lepkiej otoczki śluzowej mikroorganizmów, kokcydów lub pasożytów, może eliminować działanie antybiotyków, kokcydiostatyków lub związków przeciwpasożytniczych dodawanych zwykle do pokarmu. Enzymy zdolne do zmniejszania lepkości wydzieliny śluzowej jelit mogą spełniać rolę aktywatorów antybiotyków, kokcydiostatyków i związków przeciwpasożytniczych. Fakt ten może tłumaczyć częściowe zmniejszenie śmiertelności w grupie doświadczalnej. Substancje enzymatyczne wytworzone sposobem według wynalazku mogą pozwolić na ograniczenie dawki antybiotyków, kokcydiostatyków i związków przeciwpasożytniczych dodawanych zwykle do pokarmu dla zwierząt bez zmniejszenia roli ochronnej zapewnianej przez te 3 typy związków.

Z drugiej strony, substancje enzymatyczne wytworzone sposobem według wynalazku ułatwiają wchłanianie pewnych leków dla zwierząt, co zostało przedstawione w przykładzie III. Substancje te są więc używane do przygotowywania różnych mieszanek dla zwierząt.

Mieszanki paszowe dla zwierząt zawierają przynajmniej jedną z substancji A, B lub C. Stosowane są w ilości od 1000 do 20000 j na kg ciężaru ciała na dzień. Dla substancji enzymatycznych stosuje się przed ich użyciem związki balastowe albo stałe jak laktoza albo płynne, bądź otoczki ochronne.

Mieszanki dla zwierząt działające na wydzielinę śluzową jelit w celu ułatwienia wchłaniania leków zawierają przynajmniej jedną z substancji A, B lub C, które są podawane w ilości od 5000 do 200000 j/kg ciężaru ciała na dzień.

W obydwu przypadkach najlepszym sposobem podawania jest podawanie doustne. Wyniki uzyskane na materiale zwierzęcym można wykorzystać w medycynie. W tym przypadku można zapewnić maksimum bezpieczeństwa stosując zamiast surowej lub częściowo oczyszczonej substancji enzymatycznej, substancję względnie oczyszczoną np. substancję D. Mieszanki dietetyczne zawierają przynajmniej jedną z substancji D lub E stosowanych w dawkach od 1000 do 20000 j/kg ciężaru ciała na dzień.

Mieszanki farmaceutyczne działające na wydzielinę śluzową jelit, zwiększają anabolizm i efektywność leków dzięki obecności przynajmniej jednej z substancji D lub E stosowanej w ilości od 5000 do 200000 j/kg ciężaru ciała na dzień.

Wydzielina śluzowa jelit jak również wydzielina śluzowa oskrzeli zawdzięcza częściowo swą lepkość obecności makromolekuł mucyny połączonych między sobą mostkami białkowymi.

W leczeniu dróg oddechowych (oskrzeli) zaproponowano stosowanie trypsyny i chymotrypsyny lecz zastosowanie ich zostało ograniczone z różnych powodów, a szczególnie z powodu obecności w wydzielinie śluzowej oskrzeli inhibitorów trypsyny, zresztą innych niż inhibitor Kunitz'a.

Wyniki doświadczeń wykazują, że te inhibitory nie mają żadnego wpływu na substancje enzymatyczne wytwarzane sposobem według wynalazku. Substancje te są więc stosowane do umiarkowanej redukcji lepkości wydzieliny śluzowej oskrzeli co przyczynia się do usunięcia nadmiaru tej wydzieliny i ułatwia działanie antybiotyków.

Oczyszczone substancje enzymatyczne takie jak substancja D dla zwierząt lub E dla ludzi są bardziej korzystne dla błony śluzowej oskrzeli, która jest bardziej delikatna i mniej rozległa niż błona jelitowa.

Substancje te stosowane są w mniejszych dawkach 500 i 50000 j/kg ciężaru ciała na dzień.

Tak samo jak wydzielina śluzowata jelit, wydzielina śluzowata szyjki macicy zawdzięcza swą lepkość obecności makromolekuł połączonych między sobą mostkami białkowymi. Działanie ograniczające lepkość wydzieliny śluzowatej jest więc działaniem ograniczonym na białka.

Wyniki badań nad lepkością wydzieliny śluzowatej szyjki macicy mają istotne znaczenie przy stosowaniu sztucznego zapłodnienia u bydła rогatego. Powodzenie pierwszej interwencji wynosi średnio 65% i wiąże się częściowo z faktem, że wydzielina śluzowata szyjki macicy o zbyt dużej lepkości powoduje tworzenie się czopów doprowadzających do zablokowania szyjki macicy co utrudnia wędrówkę plemników. Ponadto wiadomo, że powodzenie zapłodnienia jest częściowo uwarunkowane obecnością w nasieniu dostatecznej aktywności trypsynowej zapewniającej zdolność plemników do zapładniania. Wiadomo jest również, że w wydzielinie śluzowatej szyjki macicy występują pewne inhibitory trypsyny.

Produkty enzymatyczne należące do grupy powyżej określonej i wykazujące właściwości trypsynowe i niewrażliwe na inhibitory trypsyny mogą powodować ograniczoną redukcję lepkości wydzieliny śluzowatej szyjki macicy, co ma pewien wpływ na zwiększenie aktywności plemników. Substancje te mogą także ułatwiać leczenie antybiotykami chorób dróg płciowych i zwiększać skuteczność sztucznego i naturalnego zapładniania.

Oczyszczone substancje enzymatyczne stosowane są w preparatach dopochwowych i tak substancja D dla zwierząt i D lub E dla ludzi i są bardziej korzystne dla błon śluzowych pochwy i macicy, które są bardziej delikatne i mniej rozległe niż błony śluzowe jelit. Substancje te stosowane są w dawkach względnie słabszych (na ogół pomiędzy 500 i 50000 j/kg ciężaru ciała na dzień).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych enzymów proteolitycznych zdolnych do optymalizacji in vivo lepkości wydzieliny śluzowatej jelit, oskrzeli i szyjki macicy, poprzez hodowlę producenta mikroorganizmów na pożywce zawierającej źródło azotu, węgla i soli mineralnych przy napowietrzaniu środowiska hodowlanego, z n a m i e n n y t y m, że poddaje się hodowli szczepy 1998 i 2019 *Streptomyces fradiae* ze zbioru Narodowego Muzeum Przyrodniczego w Paryżu tak długo dopóki końcowe miano środowiska nie osiągnie 3000 jednostek Ansona na 1 ml, po czym otrzymane produkty fermentacji koncentruje się i oczyszcza znanymi metodami lub poddaje innej obróbce dla otrzymania odpowiedniej postaci docelowego produktu, przy czym otrzymuje się enzymy niewrażliwe na inhibitory trypsyny i zdolne do redukcji lepkości wydzieliny śluzowatej od 35 do 65%.

2. Sposób według zastrz. 1; z n a m i e n n y t y m, że hodowlę prowadzi się w temperaturze 28°C w środowisku ciekłym, w skład którego wchodzi 30 g/l mąki sojowej, 30 g/l glukozy; 0,8 g/l fosforanu dwu potasowego, 10 g/l węglanu wapniowego, przy pH 7,0 z napowietrzaniem wynoszącym 0,3 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę w czasie 60–84 godzin.

3. Sposób według zastrz. 1; z n a m i e n n y t y m, że płyn fermentacyjny po przesączeniu zagęszcza się w próżni do otrzymania stężenia produktu enzymatycznego około 50000 j/ml.

4. Sposób wg zastrz. 1; z n a m i e n n y t y m, że koncentrat produktu enzymatycznego poddaje się rozpyłowemu suszeniu i otrzymuje stały produkt o mocy 100 j/mg.

5. Sposób wg zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że roztwór fermentacyjny zadaje się siarczanem amonowym i wytrącający produkt enzymatyczny suszy w próżni do uzyskania stałego produktu enzymatycznego o mocy 1000 j/mg.

6. Sposób według zastrz. 5; z n a m i e n n y t y m, że produkt enzymatyczny wytrąca się z roztworu fermentacyjnego siarczanem amonowym, zawiesza w acetonie i suszy w próżni do uzyskania produktu enzymatycznego o mocy 10000 j/mg.

7. Sposób według zastrz. 6; z n a m i e n n y t y m, że po strąceniu siarczanem amonowym i zawieszeniu w acetonie produkt enzymatyczny poddaje się elektroforezie lub chromatografii i otrzymuje się stały produkt enzymatyczny o mocy 50000 j/mg.

T a b l i c a 11

Dawki dzienne stosowanych substancji enzymatycznych

Ilość minimalna substancji enzymatycznej	Zwierzęta			Dawka dzienna	Ludzie			Dieta
	Leczenie				Leczenie			
	Miejsce działania				Miejsce działania			
	Wydzielina śluzowata jelit	Wydzielina śluzowata oskrzeli	Wydzielina śluzowata szyjki macicy		Wydzielina śluzowata jelit	Wydzielina śluzowata oskrzeli	Wydzielina śluzowata szyjki macicy	
50 000 j/ml 100 j/mg 1 000 j/mg 10 000 j/mg 50 000 j/mg	5000 do 20000 j/mg ciężaru ciała	500 do 50000 j/mg ciężaru ciała	500 do 50000 j/mg ciężaru ciała	1000 do 20000 j/kg ciężaru ciała	5000 do 20000 j/kg ciężaru ciała	500 do 50000 j/kg ciężaru ciała	500 do 50000 j/kg ciężaru ciała	1000 do 20000 j/kg ciężaru ciała

87 286

