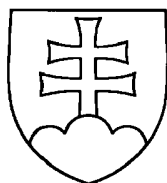


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 06.11.96  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 95203018.7,  
60/006 723  
(32) Dátum priority: 07.11.95, 14.11.95  
(33) Krajina priority: EP, US  
(40) Dátum zverejnenia: 06.05.98  
(86) Číslo PCT: PCT/EP96/04881, 06.11.96

(21) Číslo dokumentu:

# 907-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> :

**A 23K 1/00,**  
C 12N 9/16,  
C 12N 9/24,  
C 12N 15/82

(71) Prihlasovateľ: GIST-BROCADES B.V., Delft, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Beudeker Robert Franciscus, Den Hoorn, NL;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Stabilná kompozícia obsahujúca transgénny rastlinný materiál**

(57) Anotácia:  
Kompozícia obsahuje ako aktívnu zložku polypeptid. Kompozícia je získaná termomechanickým pôsobením ako je granulovanie, vytlačanie alebo expanzia na neupravený materiál, ktorý obsahuje transgénny rastlinný materiál, v ktorom bol polypeptid biosyntetizovaný príslušnou expresiou uvedeného transgénu. Kompozícia je prevažne používaná ako krmivo alebo ako zmes krmív pre zvieratá.

Stabilná kompozícia obsahujúca transgénny rastlinný materiál

### Oblasť techniky

Vynález popisuje použitie enzýmov v priemyselných postupoch, ktorým je príprava potravinových alebo krmivových kompozícií.

### Doterajší stav techniky

Použitie enzýmov v krmivách pre zvieratá pre hospodárske zvieratstvo je stále častejšie využívané. Tieto enzýmy sú produkované mikroorganizmom, ktorý je využívaný vo veľkom rozsahu vo fermentéroch, najmä v priemyselnej príprave enzýmov. A nakoniec fermentačná perióda a bujón mikroorganizmov sú predmetom mnohých filtračných krokov na oddelenie biomasy z týchto enzýmov. Roztok enzýmov je predávaný ako kvapalina po prídavku rôznych stabilizátorov, alebo je vyrábaný ako suchá formulácia.

Kvapalné enzýmy a suché formulácie sú používané v komerčnom rozsahu v krmivárskom priemysle. Kvapaliny môžu byť aplikované do krmiva po granulácii s preventívnym inaktivačným zahrievaním enzýmov pomocou granuláčnych procesov. Problém je však to, že množstvo enzýmov v konečnom krmivovom prípravku je veľmi malé a vytvára ťažko realizovateľnú homogénnu distribúciu molekúl enzýmov do krmiva. Kvapaliny sú všeobecne horšie miešateľné ako suché zložky. Sú nutné špecifické opatrenia pre prídanie potravín do krmív po granulácii, ktoré nie sú bežné pri viac mletých krmivách.

Suché formulácie enzýmov, na druhej strane, majú nevýhody v inaktivácii enzýmov počas granulácie. Počas granulácie je krmivo stlačené cez materiál a takto vytvorené je krájané do vhodných granuliek s rôznym tvarom. Obsah hmoty, ktoré je včlenená do granuliek, je všeobecne medzi 18 až 19 %. Priamo po granulácii môžu teploty dosahovať od 60 do 95 °C. Kombinovaný účinok vysokého obsahu a vysokých teplôt je škodlivý pre väčšinu enzýmov. Tieto nevýhody sú tiež u ostatných typov

termomechanického pôsobenia na potravu, ako je vytlačanie a expanzia.

Tieto problémy prekonáva metóda na prípravu tepelne stabilných enzýmových premixov, obsahujúcich jeden alebo viac enzýmov, ktoré zadržiavajú účinnú hladinu aktivity počas všeobecného peletačného procesu, ktorý bol publikovaný (Haarakita, A (1988) Európska patentová prihláška 0257 996 B1). Spôsob obsahuje tieto kroky:

zmiešanie malého množstva nosiča, ktorý je fyziologicky prijateľný a schopný absorbovať vodný roztok enzýmu, s vodným roztokom enzýmu pre časový úsek schopný absorbovať enzým na nosič a tým utvoriť komplex nosič/enzým;

granuláciu komplexu nosič/enzým; a

sušenie granulovaného komplexu nosič/enzým s obsahom medzi 7 % až 15 % s výhodou menej ako okolo 10 % hmotnostných.

Táto metóda je pracná a výsledkom nie je zlepšená odolnosť granúliek.

Rôzne vyrábané enzýmy sú rôzne formulované rôznymi metódami na zlepšenie stability enzýmov v suchom stave počas granulácie a uskladnenia potravy. Bolo napríklad navrhnuté, aby sa formulácie vyznačovali tým, že časť produktu sú potiahnuté granuľky a tým sa mohla zlepšiť odolnosť voči granulačným podmienkam. (W0 92/12645).

Tieto úsilia zdôrazňujú nutnosť riešenia tohoto problému v priemysle a vyriešenie tohoto výrobného problému.

### Podstata vynálezu

Teraz bolo neočakávane zistené, že enzýmy sú najodolnejšie voči termomechanickým procesom, ako je granulácia, ak sú

pridávané do potravy vo forme transgénneho rastlinného materiálu, v ktorom majú byť tieto enzýmy produkované za pomoci expresie transgénu. Tento vynález popisuje termomechanické spôsoby výroby kompozície obsahujúcej ako aktívnu zložku polypeptid, v ktorom sú kompozície vyrobiteľné pomocou suroviny, ktorá obsahuje transgénny rastlinný materiál, v ktorom bol polypeptid biosyntetizovaný príslušnou expresiou tu uvedeného transgénu, termomechanickým spôsobom. Výhodným termomechanickým spôsobom je granulácia, vytlačovanie a expanzia.

Vynález popisuje použitie týchto kompozícií v potrave pre zvieratá, alebo ako jej zmesi. S výhodou sú kompozície podľa vynálezu používané v spôsobe na zvýšenie prírastku u zvierat, v ktorom sú zvieratá kŕmené krmivom s obsahom týchto kompozícií.

Vynález ďalej popisuje spôsob prípravy termomechanicky upravených kompozícií s obsahom polypeptidov ako aktívnej zložky.

Termomechanické spôsoby použité podľa tohoto vynálezu sú často používané pri komerčnej výrobe krmív, pri ktorej sa vyskytuje množstvo spôsobov ako je vytlačovanie, granulácia, expanzia, alebo ich kombinácie. Všetky tieto spôsoby sa vyznačujú vstupom tepelnej energie, obvykle vo forme pary a mechanickej energie, to znamená uskutočňovanie miešania potravy.

Granulácia je klasickou metódou výroby potravy, ktorá môže byť tiež aplikovaná ako termomechanické pôsobenie na niektorú surovinu. Suroviny sú miešané a po znížení tlaku pary pridaním niekoľkých barov sú transportované do miešanej matrice. Matrica obsahuje diery, obvykle niekoľko stoviek týchto dier, cez ktoré je produkt pretlačovaný. Je spustená rotácia ramien v matrici.

Pretlačovanie je alternatívnou cestou pre produkciu krmiva, ktorá môže byť tiež použitá ako termomechanické pôsobenie na niektorý surovinový materiál.

Suroviny sú vložené do niektorej skrutkovice, ktorá sa

všeobecne skladá z niekoľkých tlakových kruhov s klesajúcim tvarom. Tieto skrutkovité disky vedú do matrice. Teplota sa zvyšuje v závislosti od trenia produktu medzi skrutkovitou a obalom a zvyšuje sa tiež s tlakom. Rozdiel tlakov medzi vonkajšom a vnútorným extrúderom vedie k čiastočnému odpareniu vody, v konečného hľadiska a toto zapríčiňuje expanziu produktu.

Expanzia je proces, ktorý je celkovo podobný extrúzií, ale nie je tvorený materiálom v definovanej hmote a všeobecne nie je tvorený matricou.

Alternatívnou cestou pre výrobu enzýmov pre použitie v krmive pre zvieratá je cesta expresie génov nekódovaných krmivových enzýmov, ako je mikrobiálna fytáza, v rastlinách a v semenách rastlín (Pen a ostatný EP-A-0 449 375). Použitie rastlín, alebo ich semien, pre expresiu týchto enzýmov, buď priamym alebo nepriamym postupom, je porovnateľné s použitím v potrave pre zvieratá.

Transgénne rastlinné materiály podľa tohoto vynálezu s výhodou obsahujú jeden alebo viac požadovaných polypeptidov, ktoré sú produktom expresie transgénu obsiahnutého v rastline, ktorý je tvorený odvodeným rastlinným materiálom. To sa dosahuje cestou zavedenia do rastliny stavebných základov expresie s obsahom DNA sekvencií kódujúcich požadované polypeptidy majúce príslušnú účinnosť, ako je napríklad enzýmy fytáza (tento enzým je podrobne popísané v práci Pen a ostatný EP-A-0 449 375).

Transgénne rastliny a transgénny rastlinný materiál, ako sú tu definovaný, zahŕňujú rastliny (tiež ich časti a bunky týchto rastlín) a ich progény, ktoré boli geneticky modifikované použitím techník založených na rekombinácii DNA, s cieľom zvyšovania alebo zmeny produkcie požadovaných polypeptidov v rastlinách alebo v orgánoch rastlín.

V tomto prípade je transgén chápaný ako špecifická genetická modifikácia, to znamená ako sekvencia nukleozidu v transgéne

rastliny.

V kompozícií podľa vynálezu sú polypeptidy aplikované ako aktívne zložky, zatiaľ čo aktívna zložka je definované ako zakódovaná pomocou transgénu.

Polypeptidy používané podľa vynálezu môžu byť produkované konštitučne v transgénnych rastlinách, vo všetkých pletivách počas všetkých vývojových štádií rastlín. V niektorých prípadoch, ako je napríklad degradácia enzýmov v bunkovej stene, môže byť požadované obmedzenie expresie transgéennej špecifickej časti rastliny, v ktorej požadovaná expresia polypeptidov neprekáča interferencií rozvíjania hostiteľského tkaniva. Gény kódujúce žiaduce polypeptidy môžu byť tiež vyjadrené v konštrukcii -/ alebo zvláštnym tkanivovým spôsobom. Tieto gény môžu byť riadené promótorom indukcie. Vo výhodnej realizácii vynálezu sú použité neprerušené, mleté alebo rozmelené časti, v ktorých bol požadovaný polypeptid špecificky vyjadrený použitím špecifickeho promótoru - semena. Avšak bude evidentné z tohoto doterajšieho stavu techniky, že expresia polypeptidov v ďalších rastlinných orgánoch je ekvivalentná a môže viesť k podobným výhodám počas aplikácie, ako je popísané v tomto vynálezu.

Výber druhu rastlín je najprv určený použitím rastlín alebo ich častí a prístupnosťou pre transformáciu. V súvislosti s týmto vynálezom sú rastliny vybrané z nasledujúcej skupiny, ale táto skupina rastlín neobmedzuje vynález. Týmito rastlinami sú: poľnohospodárske plodiny, ako je obilie pre prípravu potravín, ďalej karfiol (*Brassica oleracea*), artičoka (*Cynara scolymus*), ovocie ako sú jablká (*Malus*, ako napríklad *domesticus*), banány (*Musa*, ako napríklad *acuminata*), egreš, ríbezle (*Ribes*, ako napríklad *rubrum*), višne a čerešne (*Prunus*, ako napríklad *avium*), uhorka (*Cucumis*, ako napríklad *sativus*), vinič hroznorodý (*Vitis*, ako napríklad *vinifera*), citrón (*Citrus limon*), melón (*Cucumis melo*), orechy (*Juglans*, ako napríklad *regia*, *Arachis hypogaeae*), pomaranč (*Citrus*, ako napríklad *maxima*), broskyňa (*Prunus*, ako napríklad *persica*), hruška (*Pyrus*, ako napríklad *communis*), slivka

(Prunus, ako napríklad domestica), jahoda (Fragaria, ako napríklad moschata), paradajka (Lycopersicon, ako napríklad esculentum), lucerna (Medicago, ako napríklad sativa), kapustovité (ako napríklad Brassica oleracea), štrbák (Cichorium, ako napríklad endivia), pór (Allium, ako napríklad porrum), hlávkový šalát (Lactuca, ako napríklad sativa), špenál (Spinacia, ako napríklad oleraceae), tabak (Nicotiana, ako napríklad tabacum), koreňová zelenina, ako je maranta trstínová (Maranta, ako napríklad arundinacea), repa (Beta, ako napríklad vulgaris), mrkva (Daucus, ako napríklad carota), kasave (Manihot, ako napríklad esculenta), kvaka (Brassica, ako napríklad rapa), reďkovka (Raphanus, ako napríklad sativus), jam (Dioscorea, ako napríklad esculenta), batat (Ipomoea batatas) a semená: fazule (Phaseolus, ako napríklad vulgaris), hrach (Pisum, ako napríklad sativum), mliek zvrhľý (Glycin, ako napríklad max), jačmeň (Hordeum, ako napríklad vulgare), kukurica (Zea, ako napríklad mays), ryža (Oryza, ako napríklad sativa), repkové semeno (Brassica napus), proso siate (Panicum L.), slnečnica (Helianthus annuus), ovos siaty (Avena sativa), hľuzy, ako sú: zemiaky (Solanum, ako napríklad tuberosum), kareláb (Brassica, ako napríklad oleraceae) a podobné.

Výhody tohoto vynálezu spočívajú v tom, že polypeptidy, ak sú pridané do kompozície ako aktívna prímes a vo forme transgénneho rastlinného materiálu, sú viac odolné voči inaktivácii počas jednotlivých krokov pri termomechanických postupoch, ako je tabletovanie, v porovnaní so všeobecnými úpravami a postupmi, v ktorých boli pridané polypeptidy ako kompozície.

Bude zrejmé, že tieto výhody nie sú nevyhnutne obmedzené na špecifické stelesnenie určitých príkladov, ktoré sú zahrnuté v tejto prihláške; to znamená enzýmy ako je fytáza alebo xylanáza, ktoré sú pridávané do kompozícií pre tabletovanie a používané ako výživa pre zvieratá.

S ohľadom na výhody podľa tohoto vynálezu by mohli byť

používané niektoré kompozície, ktoré sú podrobené termomechanickému pôsobeniu a ktoré obsahujú jeden alebo viac polypeptidov ako aktívne látky.

Výhody podľa tohoto vynálezu budú lepšie vysvetlené v prípade polypeptidov s citlivosťou na biologickú aktivitu, to znamená citlivých voči tepelnej inaktivácii.

Termosenzitívne polypeptidy sú tu definované ako polypeptidy s veľkou biologickou účinnosťou, ktorá sa stráca pri termochemickom postupe použitom podľa vynálezu.

Vo výhodnej realizácii vynálezu sú polypeptidy a/alebo DNA sekvencie, ktoré ich kódujú, heterológne s ohľadom na transgénnu hostiteľskú rastlinu, v ktorých prebieha expresia DNA sekvencií.

Heterológny tu znamená, že DNA sekvencie a/alebo polypeptidy nepochádzajú z hostiteľského organizmu, to znamená, že sú odvodené od ďalších rastlinných druhov, cicavcov alebo mikroorganizmov, ako sú huby alebo baktérie.

Predložený vynález je predovšetkým výhodný, ak prebieha expresia glykozilovaných proteínov v transgénnych rastlinách, zatiaľ čo ich glykozilácia sa môže líšiť v prírode sa vyskytujúcich celých častí týchto proteínov.

Výhodnými enzýmami podľa tohoto vynálezu sú enzýmy použité pre výživu zvierat. Výživou pre zvieratá je tu rozumené, že tiež zahrnuje obľúbenú potravu. Funkciou týchto enzýmov je zlepšenie konverzného pomeru výživy, to znamená pomocou znižovania viskozity alebo pomocou znižovania antivýživového účinku určitých výživových zlúčenín.

Alternatívne môžu byť výživové enzýmy (ako je fytáza) použité na znižovanie množstva zlúčenín v hnojivách, ktoré sú škodlivé voči životnému prostrediu. Výhodnými enzýmami pre tieto

účely sú:

fosfatáza, ktorou je výhodne fytáza a/alebo kyseliny fosfatázy;

karbohydratáza, ako sú amylotické enzýmy a pletivo rastlinných buniek degradované enzýmami v ktorých je s výhodou celulóza, hemicelulóza alebo galaktáza;

proteáza, ktorou je výhodne proteáza s neutrálnym a/alebo kyslým pH;

lipáza, ktorou je výhodne fosfolipáza, ktorou je výhodne pankreatická fosfolipáza cicavcov A2.

Fosfolipidy podľa vynálezu môžu obsahovať neenzymatické biologické účinnosti, ako sú antigénne determinanty, ktoré sa používajú ako vakcíny a/alebo vystavané polypeptidy, ktoré zvyšujú obsah esenciálnych aminokyselín.

Priemernému odborníkovi v tomto obore bude jasné, že vynález môže byť uskutočnený pomocou kombinácie požadovaných polypeptidov, v ktorých sú obsiahnuté kombinácie rôznych transgénnych rastlín a expresie rôznych požadovaných polypeptidov, tak ako kombinácie rôznych požadovaných polypeptidov, u ktorých prebieha vzájomná expresia v jednej transgénnej rastline.

Ďalšou výhodnou realizáciou vynálezu je tabletovacia stabilita fytáza *Aspergillus niger*, ktorá bola testovaná, ak je enzým obsiahnutý v mletých semenách olejnatého semena repky (*Brassica napus*), v ktorom prebehla expresia génu fytázy *A. niger*.

Klonovanie génu fytázy *A. niger* je popísané van Gorcom et al. v EP-A-0 420 358.

Ďalšou výhodnou realizáciou tohto vynálezu je tvorba stabilnej labľety endoxyľanázy *Aspergillus*, ktorá je uskutočnená pomocou expresie génu huby kódovanej týmto enzýmom v semenách ľabaku. Klonovanie *Aspergillus* endoxyľanázového génu bolo presnejšie popísané v EP-A-0 463 7066 .. Graff et al.

### Príklady realizácie vynálezu

#### Príklad 1

**Stabilná špecifická expresia semena *Aspergillus niger* fytázového génu pomocou riadenia promotora kruciferínu v olejnatých semenách**

Podrobný popis spôsobu aplikovaný na expresiu semien hubovej fytázy v semenách repky olejky bol popísaný v EP-A-0 449 375 Pen et al. (1991), ktorý je začlenený tu v odkazoch. V podstate binárny vektor pMOG23 (uložený v *E. coli* K12 DH5a, v centrálnej zbierke Schimmel Cultures 29.1.1990 pod číslom CBS 102.90) bol použitý ako východisková ľátka pre konštrukciu špecifickej expresie vektora pre fytázu. Špecifické semeno fytázy v expresnej kazete bolo zhromaždené v pMOG23, s obsahom nasledujúcich hlavných článkov.

Transkripcia fytázy a jej dokončenie sú riadené pomocou 5' a 3'- regulátorov sekvencie odvodených od kódovaného génu *Brassica napus* 12S uloženého proteínu kruciferínu (gén cruA; Rayn et al., 1989, Nucl. Acids Res. 17: 3584). Alfalfa Mosaic Virus RNA4 vedúca sekvencia je použitá na stabilizáciu mRNA (Bredero et al., 1980, Nucl. Acids Res. 8:2213) a Tobacco PR-S signál peptidu (Cornelissen et al., 1986, Nature 321:531) je spárovaný pre zostavenie ľasti fytázy cDNA kódujúcej zrelý proteín a ďalej pre dosiahnutie extracelulárnej expresie fytázy.

Tento binárny vektor obsahuje chimérny fytázový gén, ktorý bol mobilizovaný na triparentálny mating s *E. coli* K-12 deformovanom RK2013 (s obsahom plazmidu pRK2013) (Ditta et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347), na *Agrobacterium*

deformácie LGM404 (Hoekema et al., 1983, Nature 303: 179), že obsahuje plazmid s génovou virulenciou nevyhnutnou pre prenos T-DNA do rastliny. Napätie bolo použité pre transformáciu semena (*Brassica napus* cv. Westar).

Bol odobraný sterilizovaný povrch časti stonky 5 až 6 týždenných rastlín ešte predtým ako vykvitli, ktorý bol po 24 hodinách umiestený na MS médium (Fry et al., (1987), Plant Cell Reports 6, 321) a potom spoločne kultivovaný počas 48 hodín s *Agrobacterium* na čerstvých plátkoch s rovnakým médiom. Transgénne rastliny pučali a rástli na selekčnom médiu (500 mg/l karbenicilín, 40 mg/l paromomycín) a ďalej boli analyzované, ako je to popísané v EP-A-0 449 375 Pen et al.

Pri použití vyššie uvedených postupov hodnoty exprese fytázy v olejnatých semenách repky olejky boli dosiahnuté hodnoty až do 1.0 % rozpusteného proteínu, čo zodpovedá hodnote okolo 500 FTU/g. Jedna jednotka aktivity fytázy (FTU) je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré uvoľňuje anorganický fosfor z 1,5 mM fytátu sodného v pomere 1  $\mu$ mol/mín pri 37 °C a pri pH 5,5.

## Príklad 2

### Stabilita fytázy v olejových semenách repky olejky počas tabletovania

Tabletovacie podmienky boli také, že tablety boli získané pri teplote 55 °C a potom pri podmienkach 75 °C po tabletizácii.

Dva nezávislé pokusy boli uskutočnené jeden v laboratórnom rozsahu a druhý v priemyselnom rozsahu.

Prekvapivo bolo zistené, že fytáza *Aspergillus niger*, produkovaná v semenách repky olejky, je značne odolnejšia voči tabletizačným podmienkam ako bežné komerčné formulácie fytázy v *Aspergillus niger*.

Stabilita enzýmov v ešte nemletých semenách, ktoré boli použité, je zrejme nezávislá od neporušenosti semien.

Natuphos<sup>(R)</sup> je komerčný produkt obsahujúci fytázu *Aspergillus niger*, ktorá môže byť získaná od BASF, Ludwigshafen, Germany.

### Tabuľka 1

#### Účinok tabletovania na stabilitu rôznych enzýmových formulácií

	Percento zvyškovej účinnosti	Percento zvyškovej účinnosti
Produkt	lab. mierka	Priem. mierka
Komerčný		
Natuphos <sup>(R)</sup>		
prášok	43	38
Mleté semená		
repky 100FTU/g	62	95

### Príklad 3

#### Stabilita fytázy v olejových semenách repky olejky počas mletia semien

Komerčný vývoj fytázy v olejových semenách repky zahŕňa mletie semien. Ďalej odlišné mletie podmienky boli porovnávané so stabilitou účinnosti fytázy ako exprese v olejových semenách počas mletia.

Používané mletie metódy sú dobre známe odborníkom zo stavu techniky.

Výsledky ukazujú, že rôzne druhy mletia nemajú drastický



321:531) v binárnom expresnom vektore pMOG29 (Pen et al., 1992, Bio/Technology 10:292).

Expresná kazeta v pMOG29 obsahovala tieto články: konštitutívny karfiolový mozaikový vírus (CaMV)35S promótor a dvojitým zvyšovačom (Guilley et al., 1982, Cell 30: 763); syntetický Alfalfa Mosaic vedúci vírus RNA4 vedie k stabilizácii sekvencie mRNA (Bredero et al., 1980, Nucl. Acids Res. 8: 2213); a *Agrobacterium tumefaciens* nopaline syntázy (NOS)terminátor (Bevan, 1984, Nucl. Acids Res. 12:8711).

Tento binárny vektor obsahuje chimérny endoxylanázový gén, ktorý bol mobilizovaný, v triparenterálnej matici s *E. coli* K-12 napätie RK2013 (s obsahom plazmidu PRK2013). (Ditta et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347), v *Agrobacterium* napätie LBA4404 (Hoekema et al., 1983, Nature 303: 179), že obsahuje plazmid s génovou virulenciou nevyhnutnou pre T-DNA prenos do rastliny.

Toto napätie bolo použité na transformáciu diskov listov tabaku (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR 1) podľa postupov Hurch et al. (1985, Science 227: 1229). Transgénne rastliny boli vybrané na médiu obsahujúcom 100 mg/l kanamycínu.

Značná expresia tohoto endoxylanázového génu v tabaku je výsledkom v maximálnej hladine expresie 1,5 % rozpustného proteínu v semenách, čo zodpovedá 1625 EXU na gram semena. Jedna jednotka endoxylanázovej aktivity (EXU) je definovaná ako množstvo enzýmov, ktoré je voľné 3,346 mikromólov redukcie cukrov merané ako xylozový ekvivalent z 1 % xylánu z ovsu slateho, pšenice pri 40 °C pri pH 3,5.

#### Príklad 5

#### Stabilita endoxylanázy v tabákových semenách počas tabletovania

Tabletovacie podmienky boli také, že jedlo bolo obdržané pri

teplotě 65 °C, počas stavu a 75 °C po tabletování.

Experimenty boli uskutočnené v laboratórnom rozsahu. Mleté semená a mikrobiálny enzýmový produkt s označením označené ako Iyxasan Forte<sup>®</sup> (získaný z BASF, Ludwigshafen, Germany) bol pridaný do jedla na konečnú koncentráciu 6 500 EXU/kg krmiva.

Záver je taký, že endoxylanáza produkovaná v semenách je značne odolnejšia voči tabletizácii ako bežné formulácie obsahujúce mikrobiálny enzým.

### Tabuľka 3

#### Účinok stability tabletovania rôznych formulácií endoxylanázy

	Percentá zvyškovej aktivity
Komerčný Iyxasan Forte <sup>®</sup> - prášok	15
Mleté tabákové semená s expresiou endoxylanázy	50

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Termomechanicky spracovaná kompozícia obsahujúca ako aktívnu zložku polypeptid, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že kompozícia je získaná termomechanickým pôsobením na neupravený materiál, ktorý obsahuje transgénny rastlinný materiál, v ktorom bol polypeptid biosyntetizovaný príslušnou expresiou transgénneho materiálu tu uvedeného.

2. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že termomechanický spôsob je vybraný z granulovania, vytlačania a expanzie alebo ich kombinácií.

3. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 2, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že transgénnym rastlinným materiálom je semeno.

4. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že polypeptid je heterológny voči transgénnej rastline.

5. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že polypeptidom je enzým.

6. Kompozícia podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že enzým je vybraný zo skupiny obsahujúcej fosfatázu, karbohydrázu, proteázu a lipázu.

7. Kompozícia podľa nároku 6, kde enzýmom je fungálna fytáza a/alebo fungálna xylanáza.

8. Použitie kompozície uvedenej v niektorom z predchádzajúcich nárokov 1 až 7 ako krmiva pre zvieratá alebo ako jeho zmes.

9. Spôsob podpory rastu zvierat, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zviera je nakŕmené krmivom, ktoré obsahuje kompozíciu, ktorá je definovaná v niektorom z predchádzajúcich nárokov 1 až 7.

10. Spôsob výroby termomechanicky spracovanej kompozície, ktorá obsahuje polypeptid ako aktívnu zložku, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že neupravené materiály obsahujú rastlinný transgénny materiál, v ktorom bol biosyntetizovaný polypeptid príslušnou expresiou tu uvedeného transgénneho materiálu, ktorý je podrobený termomechanickému spracovaniu, ktoré je výhodne vybrané z granulácie, vytlačania alebo expanzie.