(19) UA (11) 77 381 (13) C2

(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2000020609, 06.05.1999

(24) Дата начала действия патента: 15.12.2006

(30) Приоритет: 06.05.1998 EP 98401101.5

(46) Дата публикации: 15.12.2006A23K 1/165
20060101CFI20061110RMUA A23K
1/18 20060101CLI20061110RMUA
A23K 3/03
20060101ALI20051008RMUA C12N
1/14 20060101CLI20061110RMUA
C12N 1/15
20060101CLI20061110RMUA C12N
1/19 20060101CLI20061110RMUA
C12N 1/21
20060101CLI20061110RMUA C12N
5/10 20060101CLI20061110RMUA
C12N 9/16
20060101CLI20061110RMUA C12N
9/18 20060101CLI20061110RMUA
C12N 9/24
20060101CLI20061110RMUA C12N
9/42 20060101CLI20061110RMUA
C12N 11/00
20060101CLI20061110RMUA C12N
15/09 20060101CLI20061110RMUA
C12R 1/80
20060101ALN20051220RMUA

(86) Заявка PCT:
PCT/IB99/00856, 19990506

(72) Изобретатель:
Сабатье Ален, FR,
Фиш Невил Маршал, GB,
Эг Нигель Патерсон, GB

(73) Патентовладелец:
АДИССЕО ФРАНС САС, FR

(54) ШТАММ PENICILLUM FUNICOLOSUM, СМЕСЬ ФЕРМЕНТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ЭТОГО ШТАММА, И КОМПОЗИЦИИ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ СМЕСЬ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ КОРМЛЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к новому микроорганизму, Penicillum funicolosum, к полученной из него новой смеси ферментов и к их последовательностям нуклеиновых кислот.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 12, 15.12.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

UA 77381 C2

UA 77381 C2

(19) UA (11) 77 381 (13) C2

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL PROPERTY

(12) DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION

(21), (22) Application: 2000020609, 06.05.1999

(24) Effective date for property rights: 15.12.2006

(30) Priority: 06.05.1998 EP 98401101.5

(46) Publication date: 15.12.2006A23K 1/165
20060101CFI20061110RMUA A23K
1/18 20060101CLI20061110RMUA
A23K 3/03
20060101ALI20051008RMUA C12N
1/14 20060101CLI20061110RMUA
C12N 1/15
20060101CLI20061110RMUA C12N
1/19 20060101CLI20061110RMUA
C12N 1/21
20060101CLI20061110RMUA C12N
5/10 20060101CLI20061110RMUA
C12N 9/16
20060101CLI20061110RMUA C12N
9/18 20060101CLI20061110RMUA
C12N 9/24
20060101CLI20061110RMUA C12N
9/42 20060101CLI20061110RMUA
C12N 11/00
20060101CLI20061110RMUA C12N
15/09 20060101CLI20061110RMUA
C12R 1/80
20060101ALN20051220RMUA

(86) PCT application:
PCT/IB99/00856, 19990506

(72) Inventor:
Sabatier Alain, FR,
Fish Neville Marshall, GB,
Haigh Nigel Paterson, GB

(73) Proprietor:
ADISSEO FRANCE SAS, FR

(54) PENICILLIUM FUNICULOSUM STRAIN, ENZYMES MIXTURE OBTAINED THEREFROM AND COMPOSITIONS CONTAINING ENZYMES MIXTURE FOR ANIMAL FEEDING

(57) Abstract:

The present invention relates to novel micro-organism, Penicillium funiculosum, to new enzymes mixture obtained from it and nucleic sequences thereto.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 12, 15.12.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

UA 77381 C2

UA 77381 C2

(19) UA (11) 77 381 (13) C2

(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2000020609, 06.05.1999

(24) Дата набуття чинності: 15.12.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 06.05.1998 EP 98401101.5

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.12.2006A23K 1/165 20060101CFI20061110RMUA A23K 1/18 20060101CLI20061110RMUA A23K 3/03 20060101ALI20051008RMUA C12N 1/14 20060101CLI20061110RMUA C12N 1/15 20060101CLI20061110RMUA C12N 1/19 20060101CLI20061110RMUA C12N 1/21 20060101CLI20061110RMUA C12N 5/10 20060101CLI20061110RMUA C12N 9/16 20060101CLI20061110RMUA C12N 9/18 20060101CLI20061110RMUA C12N 9/24 20060101CLI20061110RMUA C12N 9/42 20060101CLI20061110RMUA C12N 11/00 20060101CLI20061110RMUA C12N 15/09 20060101CLI20061110RMUA C12R 1/80 20060101ALN20051220RMUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору PCT:
PCT/IB99/00856, 19990506

(72) Винахідник(и):
Сабатьє Ален , FR,
Фіш Невіл Маршал , GB,
Ег Нігель Патерсон , GB

(73) Власник(и):
АДІССЕО ФРАНС САС, FR

(54) СУМІШ ФЕРМЕНТІВ

(57) Реферат:
Даний винахід належить до нового мікроорганізму, Penicillum funicolosum, до одержаної із нього нової суміші ферментів і до їх послідовностей нуклеїнових кислот.

UA 77381 C2

UA 77381 C2

Опис винаходу

Даний винахід відноситься до нового мікроорганізму, нових ферментів і нової суміші ферментів. Крім того, цей винахід відноситься до композиції суміші ферментів, до її одержання і використання в харчовій промисловості, у виробництві кормів та в інших галузях промисловості, включаючи (але не обмежуючись ними) паперову і текстильну промисловість.

Протягом тривалого часу ферменти використовували для широкого кола різноманітних промислових застосувань. Відомими є приклади з хлібопекарської промисловості, виноробства і виробництва фруктових соків (де ферменти використовують для руйнування пектинів і В-глюканів), текстильної промисловості (де целюлази використовують для одержання м'яких і гладеньких целюлозних тканин) і також, що аж ніяк не є останнім застосуванням, для приготування кормів для тварин. У цьому випадку ферменти покращують перетравлення кормів із рослинних джерел.

Останнє застосування забезпечує більш ефективне перетравлення корму тваринами. Цінність корму можна визначити за FCR (Feed Conversion Ratio або витрати корму на одиницю продукції), живильною цінністю, кількістю корму, який витрачають, по відношенню до збільшення маси тварини. Зниження величини FCR для корму вказує на пропорційне збільшення маси тварини, тобто на те, що тварина здатна використовувати корм більш ефективно.

Погана засвоюваність компонентів корму (крохмаль, жир, білок/амінокислоти) є відмінною особливістю кормів на основі злакових і, наприклад, особливо тих, в яких вміст ячменю або пшениці є високим. В цих випадках може виявитися необхідним підготовляти корми так, щоб вони містили більш високі рівні енергії з інших джерел та таких інших добавок, як амінокислоти. Ці ферменти підвищують величину очевидної обмінної енергії (Apparent Metabolizabie Energy) включених в корм злакових.

Іншим підходом до розв'язання цієї проблеми було уведення ферментних добавок, целюлаз, ендо-1,3(4)-В-глюканаз(В-глюканази), ендо-1,4-В-ксиланаз (ксиланази) і т.д., або сумішей ферментних активностей до таких кормів на основі злакових. Ферментні добавки можуть мати специфічне застосування для гідролізу В-глюканів або для гідролізу арабі-ноксиланів, які перебувають в злакових (звичайно в ячмені і пшениці). Додавання ферментів переслідує різноманітні цілі. Однією з переваг, яка, безумовно, забезпечує ефективність ферментних добавок до кормів, є зниження в'язкості матеріалів у травному тракті тварин, що одержують корм на основі злакових, який містить відповідну ферментну добавку. Вища в'язкість обумовлена, частково, присутністю В-глюканів і арабіноксиланів у ячмені та пшениці. Нижча в'язкість, що є результатом дії ферментів, забезпечує більш легку абсорбцію живильних компонентів у травному тракті тварин. Іншою перевагою є виділення живильних речовин, що містяться в стінках клітин злакових, що знижує необхідність в інших дорогих кормових добавках. Загальним результатом є значне зниження вартості кормів з аналогічним або більш високим ефектом за вимірами FCR.

Було розкрито, що ферментні препарати, отримані із широкого кола різноманітних мікроорганізмів, підвищують засвоюваність кормів.

З урахуванням відомого рівня, пов'язаного з використанням ферментів в кормах для тварин, автори вказують європейську патентну заявку [EP, 0699762], в якій розкрито використання виділеної з Schwanniomyces occidentalis фітази. Ця фітаза являє собою фітазу, отриману з генетично модифікованого організму, отриманого шляхом вбудовування клонованого гену, чого автори хотіли б уникнути в даному винаході.

Що стосується патентної заявки [WO, 95/26398], там модифіковану целюлазу також одержують шляхом вбудовування чужорідної послідовності ДНК в клітину-хазяїна, яка модифікує природу вихідного штаму, що обраний із такого переліку мікроорганізмів: Bacillus, Streptomyces, Saccharomyces, Schizosacch aromyces, Aspergillus. Основною метою авторів даного винаходу було уникнути вбудовування чужорідного гена в мікроорганізм, який продукує фермент.

В патентній заявці [WO, 96/05739] суміш ферментів (ксиланази, протеази і необов'язково В-глюканази) одержують із різноманітних мікроорганізмів. Автори наводять приклад (суміші ферментів з відношенням ксилазної активності до В-глюканазної активності порядку 1:5. Було виявлено, що коли ксилаза включена в раціон на основі злакових в оптимальній дозі або близько до цього, спільна присутність ферментів, які виявляють В-глюканазну активність, підвищує FCR корму, що, природно, невигідно. Відповідно, автори виступають проти присутності В-глюканази, вони рекомендують максимальне відношення ксиланазної активності до В-глюканазної активності як 1:(0-0,25).

В деяких випадках, для того, щоб забезпечити всі ферментні активності, пов'язані із застосуванням кормів, доводиться одержувати препарати з препаратів, отриманих більш ніж з одного мікроорганізму. В ряді випадків ферментні препарати були отримані з мікроорганізмів, які піддавалися генетичним модифікаціям із використанням методик рекомбінантних ДНК.

Автори виявили новий мікроорганізм, що належить до класу Penicillum funicolosum, який містить нові ферменти, і розробили суміш ферментних активностей, яку з успіхом можна використовувати для підвищення, головним чином, засвоюваності кормів для тварин на основі злакових.

Відповідно, даний винахід відноситься до нового мікроорганізму, отриманого з Penicillum funicolosum, та до способу культивування цього мікроорганізму і виділення ферментів, які продукує цей мікроорганізм.

Крім того, згідно із даним винаходом, запропоновані нові ферменти, виділені з цього мікроорганізму, їх послідовності нуклеїнових кислот і нові композиції, що містять ці ферменти.

Далі, відповідно до цього винаходу, запропоновано спосіб підвищення засвоюваності амінокислот і кормів

UA 77381 C2

UA 77381 C2

для тварин на основі амінокислот і злакових.

Іншою метою даного винаходу є зменшення виділення фосфору і виділення аміаку з клітинної батареї, де годують тварин.

А. Новий штам Penicillum funicolosum

Цей новий штам грибків Penicillum funicolosum депонований під реєстраційним номером IMI378536 в ізмасатному Міжнародному Депозитарії у відповідності із Будапешською Угодою (1977р.), Міжнародним Інститутом Мікології (International Mycological Institute (IMI), Bakeham Lane, Engiefield Green, Egham, Surrey, TW209TY, UK).

Походження

Новий штам отримано із Penicillum funicolosum IMI 134756 після успішного УФ опромінення і В-опромінення спор, включно із скринуванням на селективному середовищі. Ніяких генетичних модифікацій не було отримано за допомогою методик рекомбінантних ДНК із використанням вбудовування чужорідних ДНК або РНК.

Ідентифікація і типування

Penicillum funicolosum IMI 134756 було охарактеризовано шляхом вирощування на Czapek Dox агарі при 25°С. Характеристики колонії і мікроморфологія є типовими для Penicillum funicolosum. Ідентифікація мікроорганізму як Penicillum funicolosum була підтверджена в Міжнародному Інституті Мікології (International Mycological Institute (IMI), Bakeham Lane, Engiefield Green, Egham, Surrey, TW209TY, UK). Ріст схожий на щільно базальну повстину, з аеральним ростом, у вигляді ниток або вузликів гіфів (funiculose), міцелій білого кольору з основою червоного кольору в субстраті, поля, навпаки, бліді, але пофарбовані червоним у напрямку до центрів, можуть ставати темно-червоними. Це типовий пеніцилін, він демонструє короткий кондіофорез, що виникає, головним чином, із funicles, biverticillate, голчастих, конідіогенних клітин, конідії еліптичні та гладенькі.

Мікроорганізм, використаний для одержання препарату ферментів даного винаходу, вирощують в аеробних умовах в середовищі, яке містить целюлозу, сироп від замочування кукурудзи, карбонат кальцію і сульфат амонію.

В. Процес ферментації

Ці нові грибки одержують шляхом ферментації депонованого штаму спочатку на засіяному середовищі, яке переважно складається з, мас. %:

розчин від замочування кукурудзи	1-4;
агент, що перешкоджає піноутворенню	щоб уникнути утворення піни;
води	до 100;
NaOH (перед стерилізацією середовища)	до pH 3,0-6,0.

Температура інкубування 27-36°С.

Ферментаційне середовище переважно має такий склад, мас. %:

розчин від замочування кукурудзи	0-4;
целюлоза (занурюють та подають)	0,8-14,0;
сіль кальцію	0-0,8;
сульфат амонію	0-1,0;
агент, що перешкоджає піноутворенню	щоб уникнути утворення піни;
вода	до 100;
NaOH (перед стерилізацією середовища)	до pH 3,0-6,0;
H_2SO_4	для підтримання pH 3,0-6,0;
аміак	для підтримання pH 3,0-6,0.

Температура інкубування 27-36°С.

Для ферментації у ферментер завантажують достатню кількість води, додають інгредієнти до води в прийнятному контейнері із пристосуванням для перемішування, перемішують доти, поки інгредієнти не розчиняться. Стерилізують, герметизуючи ферментер і підвищуючи температуру вмісту звичайно до 121 °С. Вміст ферментера інокулюють за-травним ферментаційним середовищем.

Основним джерелом вуглецю, який додають в процесі ферментації, є целюлоза; із різноманітних джерел целюлози автори надають перевагу використанню ARBOCEL, SOLKAFLOC CLAROCEL, ALPHACEL, FIBRACEL різноманітних ступенів чистоти.

Величину pH в процесі ферментації переважно контролюють, додаючи сірчану кислоту або іншу кислоту й аміак у газоподібному або рідкому вигляді, чи іншу основу.

У кінці ферментації тверді речовини видаляють фільтруванням або центрифугуванням, збирають і концентрують рідку фазу, наприклад, ультрафільтрацією або на органічних або мінеральних мембранах.

Ці ферменти можна також одержати за допомогою методик рекомбінантних ДНК, і таким чином вони будуть продукуватися рекомбінантними гомологічними або гетерологічними видами. Хазяїна для переносу гена, що кодує фермент, можна вибрати з видів грибків, бактеріальних клітин або рослинних клітин. Для вбудовування гену, кодуючого потрібний фермент, в такі клітини-хазяїни як плазміди (інтегративно або ні), вектори фагів та вектори вірусів, можна використовувати будь-які зручні способи. Penicillum funicolosum, що включає вставку гетерологічних генів або модифікацію геному гомологічними генами за рахунок вставок, делецій або модифікацій зазначеного гомологічного гену, також є частиною даного винаходу.

UA 77381 C2

Відповідно до даного винаходу, можна одержати фермент у вигляді виділеного чистого препарату ферменту або у вигляді неочищеного препарату, такого, як культуральне середовище, в якому вирощували Penicillum funicolosum.

Можна також включити цей фермент або ці ферменти в композиції, які містять ще один фермент, тип якого залежить від передбачуваного використання композиції. Добавлені ферменти можна вибрати, наприклад, серед карбогідраз, ліпаз та протеаз.

С. Композиції, що складаються з "суміші ферментних активностей"

1. Рідка композиція

Для рідкої композиції після додавання протимікробних агентів здійснюють вимір концентрації ферментів і розведення до потрібної концентрації. Кращим складом рідкого розчину є такий:

мікробні продукти у вигляді всіх органічних твердих речовин	4-10%
протимікробний агент	0-0,35%
сорбіт	20-50%
антифріз (необов'язково)	0-40%
концентрований відфільтрований бульйон***)	0,3-76%
забуферений з доведенням pH 3-5.	

Протимікробний агент вибирають із таких продуктів, як сорбінова кислота та її солі, бензойна кислота та її солі, метил-4-гідроксибензоат та н-пропіл-4-гідроксибензоат, фумарова кислота, солі та естери. Можна також використовувати такі солі, як хлорид натрію або хлорид калію.

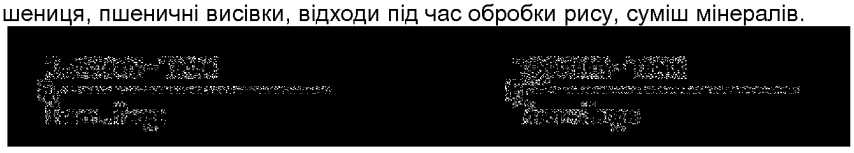
Найкращими антифрізами є 1,2-пропандіол, етиленгліколь, гліцерин.

2. Порошкова композиція

Для одержання порошкових препаратів отриманий концентрований розчин сушать необов'язково у присутності носія. Порошок, отриманий в результаті сушіння концентрованого розчину без присутності носія, можна згодом змішати з придатним носієм. Кращим складом порошкової форми композиції є такий, %:

мікробні продукти у вигляді всіх органічних твердих речовин	16%-40%
носій	59%-83%
інші висушені компоненти ферментаційного бульйону	1%

Кращі носії обирають з пшеничної муки, крохмалю, гіпсу, мальтодекстрину, твердих продуктів кукурудзи, таких побічних продуктів, отриманих під час обробки злакових культур, як кукурудзяна крупа, другосортна пшениця, пшеничні висівки, відходи під час обробки рису, суміш мінералів.



D. Характеристики ферментів

Отримано нову суміш ферментів, продукованих Penicillum funicolosum. Ця суміш ферментів містить такі нові ферменти, як целюлази, В-глюканази, ксиланази, такі супутні ксиланазні ферменти, як арабінофуранозидази та ферулоїл-естерази.

1. Процедура

Ферментний препарат охарактеризовано в різноманітних аналізах, що включають аналізи активностей целюлази, целобіогідролази, В-глюкозидази, ендо-1,3 (4)-В-глюканази, ламінариназо-ендо-1,4-р-ксиланази (із використанням різноманітних субстратів), (В-ксилозидази, арабінофуранозидази і ферулоїлестерази (із використанням різноманітних субстратів).

1.1. DNS CMC спосіб аналізу целюлази

Аналіз активності целюлази базується на ферментному гідролізі глікозидних зв'язків у карбоксиметилцелюлозі (CMC), В-1,4-глюкані. Продукти реакції, олігосахариди В-1,4-глюкану, визначають за збільшенням рівня відновлення (як глюкозу).

Розчин, що містить 1мл (1%, мас./об.) розчину CMC у 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,0 (або інші значення pH); 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 10хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2мл DNS розчину (1%, мас./об. 3,5-динітросаліцилової кислоти, 16% мас./об. гідроксиду натрію, 30% мас./об. калій-натрій (+)-тартрату в дистильованій воді). Цей розчин перемішують і поміщають в баню з киплячою водою (мінімум 95°С) на 5хв., потім охолоджують до 25°С. До розчину додають 10мл дистильованої води, і поглинання вимірюють при 540нм, використовуючи скляну кювету товщиною 2см.

Отриманий результат перетворюють в мкмоль відновленого цукру (як глюкоза), порівнюючи зі стандартною кривою для 2мл 0,00-0,04% (мас./об.) розчинів глюкози, оброблених аналогічним способом розчином DNS.

У спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій DNS розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності целюлази визначають як кількість ферменту, яке продукує 1мкмоль глюкозного еквіваленту в 1хв. в умовах аналізу (50°С і pH 5,0 або при інших значеннях pH).

1.2. Аналіз целобіогідролази з використанням п-нітрофеніл-В-D-целобіопіранозиду

UA 77381 C2

Аналіз целобіогідролази базується на ферментному гідролізі п-нітрофеніл-B-D-целобіопіранозиду. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначають колориметрично.

Розчин, що містить 1моль 0,1% (мас./об.) п-нітрофеніл-B-D-целобіопіранозиду в дистильованій воді; 1мл дистильованої води; 1мл 0,2М натрій-ацетатного буферу, pH 5,0; 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 30хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 4мл 0,4М розчину гліцину. Цей розчин перемішують і охолоджують до 20°С. Поглинання вимірюють на 400нм, використовуючи скляну кювету товщиною 1см.

Отриманий результат перетворюють у мкмоль п-нітрофенолу, порівнюючи з коефіцієнтом молярної екстинкції п-нітрофенолу в цих же умовах.

У спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій розчин гліцину добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності целобіогідролази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл-B-D-целобіопіранозиду в 1хв. в умовах аналізу (50°С і pH 5,0).

1.3. Аналіз B-глюкозидази з використанням п-нітрофеніл-B-D-глюкопіранозиду

Аналіз р-глюкозидази базується на ферментному гідролізі п-нітрофеніл-B-D-глюкопіранозиду. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначають колориметрично.

Розчин, що містить 1мл 0,1% (мас./об.) п-нітрофеніл-B-D-глюкопіранозиду в дистильованій воді; 1мл дистильованої води; 1мл 0,2М натрій-ацетатного буферу, pH 5,0; 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 30хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 4мл 0,4М розчину гліцину. Цей розчин перемішують і охолоджують до 20°С. Поглинання вимірюють на 400нм, використовуючи скляну кювету товщиною 1см.

Отриманий результат перетворюють у мкмоль п-нітрофенолу, порівнюючи з коефіцієнтом молярної екстинкції п-нітрофенолу в цих же умовах.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій розчин гліцину добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності р-глюкозидази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл-B-D-глюкопіранозиду в 1хв. в умовах аналізу (50°С та pH 5,0).

1.4. Аналіз ендо-1,3(4)-B-глюканази із використанням DNS та B-глюкану ячменя

Аналіз активності ендо-1,3(4)-B-глюканази базується на ферментному гідролізі глікозидних зв'язків у B-глюкані ячменя, B-1,3(4)-глюканази. Продукти реакції, олігосахариди B-1,3(4)-глюкану, визначають за кінцевим збільшенням рівня відновлення (як глюкози).

Розчин, що містить 1мл 1% (мас./об.) розчину B-глюкану ячменя в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,0 (або при інших значеннях pH); 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 10хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2мл DNS розчину (1%, мас./об.) 3,5-динітросаліцилової кислоти, 1,6% (мас./об.) гідроксиду натрію, 30% (мас./об.) калій-натрій (+)-тартрату в дистильованій воді). Цей розчин перемішують і поміщають в баню з киплячою водою (мінімум 95°С) на 5хв., потім охолоджують до 25°С. До розчину добавляють 10мл дистильованої води, і поглинання вимірюють при 540нм, використовуючи скляну кювету товщиною 2см.

Отриманий результат перетворюють в мкмоль відновленого цукру (як глюкози), порівнюючи із стандартною кривою для 2мл 0,00-0,04% (мас./об.) розчинів глюкози, оброблених аналогічним способом розчином DNS.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій DNS розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ендо-1,3(4)-B-глюканази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль глюкозного еквіваленту в 1хв. в умовах аналізу (50°С та pH 5,0 або при інших значеннях pH).

1.5. Аналіз ендо-1,3(4)-B-глюканази із використанням B-глюкану азо-ячменя

Аналіз активності ендо-1,3(4)-B-глюканази базується на ферментному гідролізі B-глюкану ячменя, в якого є зв'язаний хромофор (B-глюкан азо-ячменя). Продукти реакції, олігомери, які розчиняються після осадження етанолом, визначають за спостережуваним збільшенням поглинання при 590нм.

Розчин, що містить 0,5мл субстрату B-глюкану азо-ячменя (в формі, що готова для використання) та 0,2мл розведення ферменту (який містить від 0,15 до 0,60од/мл у СМС в 0,01М натрій-ацетатному буфері, pH 4,6), інкубують при 30°С точно протягом 20хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2,5мл осаджуючого розчину (що містить 18,1г ацетату натрію і 3,0г цинкової суміші, перемішаних в 300мл стакані з дистильованою водою, pH доводять до 5,0 соляною кислотою, переносять вміст у 1л мірну колбу і доводять до потрібного об'єму 96% (об./об.) етанолом). Розчин перемішують і залишають при кімнатній температурі на 10хв. Розчин переносять у центрифужну ампулу центрифугують при 1000г протягом 10хв. у лабораторній центрифузі. Поглинання рідини над осадом вимірюють при 590нм, використовуючи скляну кювету товщиною 1см.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій осаджуючий розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ендо-1,3(4)-B-глюканази визначають як кількість ферменту, що гідролізує субстрат, забезпечуючи величину поглинання 0,820од. при 590нм, використовуючи стандартний субстрат в умовах аналізу (30°С і pH 4,6).

1.6. Аналіз ламінаринази (ендо-1,3-B-глюканази) із використанням DNS і ламінарину

Аналіз активності ламінаринази (ендо-1,3-B-глюканази) базується на ферментному гідролізі глікозидних зв'язків у ламінарині, B-1,3-глюкані. Продукти реакції, олігосахариди B-1,3-глюкану, визначають за кінцевим

збільшенням рівня відновлення (як глюкози).

Розчин, що містить 1мл 1% (мас./об.) розчину ламінарину в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,0; 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 10хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2мл DNS розчину (1%, мас./об.) 3,5-динітро-саліцилової кислоти, 1,6% (мас./об.) гідроксиду натрію, 30% (мас./об.) калій-натрій (+)-тартрату в дистильованій воді). Цей розчин перемішують і поміщають в баню з киплячою водою (мінімум 95 °С) на 5хв., потім охолоджують до 25°С. До розчину добавляють 10мл дистильованої води, і поглинання вимірюють при 540нм, використовуючи скляну кювету товщиною 2см.

Отриманий результат перетворюють у мкмолі відновленого цукру (як глюкози), порівнюючи зі стандартною кривою для 2мл 0,00-0,04% (мас./об.) розчинів глюкози, оброблених аналогічним способом розчином DNS.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій DNS розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ламінаринази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль глюкозного еквіваленту в 1хв. в умовах аналізу (50°С і pH 5,0).

1.7. Аналіз ендо-1,4-В-ксиланази із використанням DNS та ксилану деревини берези

Аналіз активності ендо-1,4-В-ксиланази базується на ферментному гідролізі ксилозидних зв'язків в ксилані деревини берези, В-1,4 ксилані. Продукти реакції, олігосахариди В-1,4-ксилану, визначають за кінцевим збільшенням рівня відновлення (як ксилози).

Розчин, що містить 1мл 1% (мас./об.) розчину ксилану деревини берези в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,0 (або при інших значеннях pH); 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 10хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2мл DNS розчину (1%, мас./об.) 3,5-динітро-саліцилової кислоти, 1,6% (мас./об.) гідроксиду натрію, 30% (мас./об.) калій-натрій (+)-тартрату в дистильованій воді). Цей розчин перемішують і поміщають в баню з киплячою водою (мінімум 95°С) на 5хв., потім охолоджують до 25°С. До розчину добавляють 10мл дистильованої води, і поглинання вимірюють при 540нм, використовуючи скляну кювету товщиною 2см.

Отриманий результат перетворюють в мкмоль відновленого цукру (як ксилози), порівнюючи зі стандартною кривою для 2мл 0,00 - 0,03 % (мас./об.) розчинів ксилози, оброблених аналогічним способом розчином DNS.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакції вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій DNS розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ендо-1,4-В-ксиланази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль ксилозного еквіваленту в 1хв. в умовах аналізу (50°С і pH 5,0 або при інших значеннях pH).

1.8. Аналіз ендо-1,4-В-ксиланази із використанням DNS та арабіноксилану пшениці

Аналіз активності ендо-1,4-В-ксиланази базується на ферментному гідролізі ксилозидних зв'язків в арабіноксилані пшениці, заміщеному арабінозою В-1,4-ксилані. Продукти реакції, олігосахариди арабіно-В-1,4-ксилану, визначають за кінцевим збільшенням рівня відновлення (як ксилози).

Розчин, що містить 1мл 1% (мас./об.) розчину арабіноксилану в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,0 (або при інших значеннях pH); 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50 °С протягом 10хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 2мл DNS розчину (1%, мас./об.) 3,5-динітро-саліцилової кислоти, 1,6% (мас./об.) гідроксиду натрію, 30% (мас./об.) калій-натрій (+)-тартрату в дистильованій воді). Цей розчин перемішують і поміщають в баню з киплячою водою (мінімум 95°С) на 5хв., потім охолоджують до 25°С. До розчину добавляють 10мл дистильованої води, і поглинання вимірюють при 540нм, використовуючи скляну кювету товщиною 2см.

Отриманий результат перетворюють у мкмоль відновленого цукру (як ксилоза), порівнюючи зі стандартної кривою для 2мл 0,00-0,03% (мас./об.) розчинів ксилози, оброблених аналогічним способом розчином DNS.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій DNS розчин добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ендо-1,4-В-ксиланази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль ксилозного еквіваленту в 1хв. в умовах аналізу (50°С та pH 5,0; або при інших значеннях pH).

1.9. Аналіз ендо-1,4-В-ксиланази віскозиметричним способом із використанням арабіноксилану пшениці

Аналіз активності ендо-1,4-В-ксиланази базується на ферментному гідролізі стандартного розчину арабіноксилану пшениці. Причому активність визначають за зменшенням відносної в'язкості залежно від часу.

Розчин, що містить 1мл 1% (мас./об.) розчину арабіноксилану пшениці в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,5 (або при інших значеннях pH); 3мл дистильованої води і 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину вводять у мікровіскозиметр Haake (використовуючи золоту кульку, калібровану до 0,1-2,0мПа·с), та вимірюють час падіння кульки (Ттест) (в мс щодо визначеної висоти падіння) кожні 30с протягом 15-20хв. при 30°С. Середні часи падіння кульки вимірюють для води (5мл дистильованої води) і субстратного (1мл, 1% (мас./об.) розчину арабіноксилану пшениці в 0,1М натрій-ацетатному буфері, pH 5,5 та 4мл дистильованої води) як [redacted] і [redacted] відповідно. Проводять контрольні виміри аналогічним способом. Відносну текучість [redacted] розраховують для кожного значення [redacted] у такий спосіб:

Нахил кривої [redacted] залежно від часу (минулий час, під час якого проведено кожний вимір [redacted]), розраховують як зміну відносної в'язкості в хвилину ([redacted]), і воно є пропорційним концентрації ферменту.

Одну одиницю активності ендо-1,4-В-ксиланази визначають як кількість ферменту, що гідролізує субстрат, зменшуючи в'язкість розчину, забезпечуючи зміну відносної текучості в 1 (безвимірна одиниця) в 1хв. в умовах аналізу (30°С і pH 5,5 або при інших значеннях pH).

1.10. Аналіз В-ксилозидази з використанням п-нітрофоніл-В-D-ксилопіранозиду

Анализ В-ксилозидази базується на ферментному гідролізі п-нітрофоніл-В-D-ксилопіранозиду. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначають колометрично.

Розчин, що містить 1мл 0,1% (мас./об.) п-нітрофоніл-В-D-ксилопіранозиду в дистильованій воді; 1мл дистильованої води; 1мл 0,2М натрій-ацетатного буферу, pH 5,0; 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50°С протягом 30хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 4мл 0,4М розчину гліцину. Цей розчин перемішують і охолоджують до 20°С. Поглинання вимірюють при 400нм, використовуючи скляну кювету товщиною 1см.

Отриманий результат перетворюють у мкмоль п-нітрофенолу, порівнюючи із коефіцієнтом молярної екстинкції п-нітрофенолу в цих же умовах.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій розчин гліцину добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності ксилозидази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл-В-D-ксилопіранозиду в хвилину в умовах аналізу (50°С і pH 5,0).

1.11. Аналіз α-N-арабінофуранозидази з використанням п-нітрофеніл-α-L-арабінофуранозиду

Аналіз А-N-арабінофуранозидази (арабінофуранозиду) базується на ферментному гідролізі п-нітрофеніл-α-L-арабінофуранозиду. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначають колориметрично.

Розчин, що містить 1мл 0,1% (мас./об.) п-нітрофеніл-α-L-арабінофуранозиду в дистильованій воді; 1мл дистильованої води; 1мл 0,2М натрій-ацетатного буферу, pH 5,0; 1мл відповідним чином розведеного ферментного розчину інкубують при 50 °С протягом 30хв. Ферментну реакцію зупиняють, додаючи 4мл 0,4М розчину гліцину. Цей розчин перемішують і охолоджують до 20°С. Поглинання вимірюють на 400нм, використовуючи скляну кювету товщиною 1см.

Отриманий результат перетворюють у мкмоль п-нітрофенолу, порівнюючи з коефіцієнтом молярної екстинкції п-нітрофенолу в цих же умовах.

В спостережуване поглинання для розчинів ферментних реакцій вносять поправку на неспецифічне поглинання, здійснюючи реакцію, в якій розчин гліцину добавляють до суміші перед додаванням ферментного розчину. Одну одиницю активності арабінофу-ранозидази визначають як кількість ферменту, що продукує 1мкмоль п-нітрофенола з п-нітрофеніл-α-L-арабінофуранозиду в 1хв. в умовах аналізу (50°С і pH 5,0).

1.12. Аналіз ферулоїл-естерази FAXX методом

Аналіз ферулоїл-естерази (естерази ферулової кислоти) базується на ферментному гідролізі О-[5-О-(транс-ферулоїл)- α-L-арабінофуранозил]-(1$\rightarrow$3)-О-В-О-ксилопіранозил-(1$\rightarrow$4)-О-ксилопіранози (FAXX). FAXX одержують із ферментативно гідролізованих пшеничних висівок, очищують і характеризують за допомогою ЯМР. FAXX гідроліз визначають спектрофотометрично.

Ферментативну реакцію підтримують при довжині хвилі 325нм, використовуючи кювету товщиною 1см, у розчині, що містить 0,050М FAXX в 0,1М MOPS буфері, pH 6,0 при 37°С.

Одну одиницю активності ферулоїл-естерази на FAXX визначають як кількість ферменту, що перетворює 1мкмоль субстрату в продукт в 1хв. в умовах аналізу (37°С і pH 6,0).

1.13. Аналіз ферулоїл-естерази за допомогою Ara_2F

Аналіз ферулоїл-естерази (естерази ферулової кислоти) базується на ферментативному гідролізі Ara_2F (ферулова кислота, зв'язана по 1,2 з арабінозою). Ara_2F одержують із ферментативно гідролізованої пульпи цукрового буряка, очищують і характеризують за допомогою ЯМР. Гідроліз Ara_2F визначають спектрофотометрично.

Ферментативну реакцію спостерігають при довжині хвилі 325нм, використовуючи кювету товщиною 1см, у розчині, що містить 0,050М Ara_2F у 0,1М MOPS буфері, pH 6,0 при 37°С.

Одну одиницю активності ферулоїл-естерази на Ara_2F визначають як кількість ферменту, що перетворює 1мкмоль субстрату в продукт в 1хв. в умовах аналізу (37°С і pH 6,0).

1.14. Аналіз ферулоїл-естерази з використанням гідролізу метилових естерів: метил-ферулової кислоти (MFA); метилкофеїнової кислоти (MCA); метилсинаповой кислоти (MSA); метил-р-кумарової кислоти (MpCA)

Аналіз ферулоїл-естерази (естерази ферулової кислоти) базується на ферментативному гідролізі метилових естерів ферулової кислоти (MFA); кофеїнової кислоти (MCA); синапової кислоти (MSA); і п-кумарової кислоти (MpCA). Гідроліз метилових естерів визначають у 0,1М MOPS буфері, pH 6,0 при 37°С. Аналіз базується на двох різноманітних методиках.

У спектрофотометричному способі концентрація субстрату метилових естерів складає 0,10мМ, і за гідролізом естерів спостерігають при довжині хвилі 325нм, використовуючи кювету товщиною 1см. У цьому способі початкова концентрація субстрату обмежена.

У способі з використанням ВЕРХ концентрація субстрату метилових естерів складає 1,0мМ, і за гідролізом естерів спостерігають, вимірюючи виділення вільної кислоти за допомогою ВЕРХ із 10-30хв. інтервалами. У цьому способі немає обмеження за концентрацією субстрату, і вимірювані активності є значно вищими, ніж концентрації, які визначають спектрофотометрично.

Одну одиницю активності ферулоїл-естерази визначають як кількість ферменту, що перетворює 1мкмоль субстрату в продукт за 1хв. в умовах аналізу (37°С і pH 6,0).

1.15. Визначення концентрації білку за допомогою модифікованого аналізу Bradford зв'язування білку з Coomassie blue

Аналіз концентрації білку базується на модифікованому аналізі Bradford зв'язування білку з Coomassie blue із використанням Brilliant Blue G (кумассі-діамантовий блакитний), що вимірюється спектрофотометрично при довжині хвилі 595нм, використовуючи кювету товщиною 1см. Цей спосіб (Sigma B 6916) стандартизований із використанням альбуміну бичачої сироватки (Sigma P094).

1.16. Визначення ізоелектричної точки за допомогою ізоелектричного фокусування

Ізоелектричні точки білків визначають стандартними способами, використовуючи такі попередньо відлиті вертикальні 5% поліакриламидні гелі, як гелі від NOVEX® для інтервалу pH 3-10 (p1 інтервал 3,5-8,5) або pH 3-7 (p1 інтервал 3,0-6,5) у кюветі NOVEX® XCell II™ Mini-Cell. Використовують NOVEX® катод, анод і IFE зразкові буфери для pH 3-10 або pH 3-7. Використовують NOVEX® стандартний протокол для ізоелектричного фокусування, фіксування, фарбування барвником Coomassie R-250 Blue і знесолення.

1.17. SDS-PAGE (гель-електрофорез в натрійдодецилсульфат-поліакриламідномугелі)

Аналітичний поділ і визначення молекулярної маси білків здійснюють стандартними SDS-PAGE методами. Попередньо відлиті NOVEX® NuPAGE гелі (NuPAGE™ Bis-Tris гелі або NuPAGE™ Tris-ацетатні гелі з NOVEX® рекомендованими робочими буферами використовують у NOVEX® XCell II™ Mini-Cell. Використовують NOVEX® зразкові препаративні і робочі буфери і стандарти молекулярних мас. Використовують NOVEX® стандартні протоколи для SDS-PAGE, фіксування, фарбування барвником Coomassie R-250 Blue і знесолення.

2. Результати аналізу суміші ферментів

2.1. Оптимальні значення pH

2.1.1. Активність ендо-1,3(4)-B-глюканази

Аналіз ендо-1,3(4)-B-глюканази з Penicillum funicolosum здійснюють у стандартних умовах при 50°C, за допомогою способу із використанням DNS і B-глюкану ячменя. Ферментативну активність вимірюють при значеннях pH між 3,0 та 7,0. Оптимальні значення pH для активності ферменту складають 4,0-5,0 (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив pH на ферментативну активність ендо-1,3(4)-B-глюканази з Penicillum funicolosum

pH	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
3,0	325	42
4,0	761	98
5,0	775	100
6,0	507	66
7,0	152	20

2.1.2. Активність ендо-1,4-B-ксиланази

Аналіз ендо-1,4-B-ксиланази з Penicillum funicolosum здійснюють у стандартних умовах при 50°C, за допомогою способу з використанням DNS і ксилану деревини берези (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив pH на ферментативну активність ендо-1,4-B-ксиланази з Penicillum funicolosum

pH	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
2,0	3559	37
2,6	6700	70
3,0	8411	88
3,0	8113	85
3,5	9582	100
4,0	8523	89
4,0	8510	89
5,0	5544	58
5,5	3522	37
6,0	2190	23
7,0	1103	12

2.2. Оптимальна температура

2.2.1. Активність ендо-1,3(4)-B-глюканази

Аналіз ендо-1,3(4)-B-глюканази з Penicillum funicolosum здійснюють у стандартних умовах при pH 5,0 (оптимальне значення pH для цього ферменту) за допомогою способу з використанням DNS та B-глюкану ячменя. Ферментативну активність вимірюють при значеннях температури між 30-70 °C. Значення оптимальних температур знаходяться між 50-60 °C, причому найвища активність спостерігається при 60 °C. Результати досліджень приведені в табл. 3.

Таблиця 3		
Вплив температури на ферментативну активність ендо-1,3(4)-В-глюканази з Penicillum funicolosum		
Температура, °С	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
30	247	32
40	541	70
50	775	100
60	1082	140
70	774	96

2.2.2. Активність ендо-1,4-В-ксиланази

Аналіз ендо-1,4-В-ксиланази з Penicillum funicolosum здійснюють у стандартних умовах при pH 5,5 і 3,5 за допомогою способу з використанням DNS і ксилану деревини берези. Ферментативну активність вимірюють при значеннях температури між 30- 70°С.

Значення оптимальних температур знаходяться між 50-60 °С, причому найвища активність спостерігається при 50°С для pH 5,5 і при 60°С для pH 3,5. Результати досліджень приведені в табл. 4.

Таблиця 4				
Вплив температури на ферментативну активність ендо-1,4-В-ксиланази з Penicillum funicolosum				
Температура, °С	Активність (pH 5,5)		Активність (pH 3,5)	
	(міжнарод. од.)/хв.	%	(міжнарод. од.)/хв.	%
30	2492	41	4334	23
40	4042	66	8128	42
50	6107	100	18251	95
60	4602	75	19155	100
70	3851	63	12730	66

Ферменти, продуковані Penicillum funicolosum, відрізняються високими рівнями целюлази, ендо-1,3(4)-В-глюканази та інших глюканолітичних активностей. Крім того, вони також характеризуються високими рівнями ендо-1,4-В-ксиланази і активностями супутніх ферментів ксиланази. Широкий спектр геміцелюлолітичних ферментів є характеристикою ферментних препаратів, які отримують із цього мікроорганізму.

Кожну із вимірюваних активностей можна уявити як відношення до основної активності для цього препарату. Приклади отриманих результатів подані в табл. 5. Ці відношення можуть змінюватися в препаратах, отриманих із різноманітних партій ферментації.

Таблиця 5	
Відносні активності залежно від різноманітних субстратів	
Методи, використані під час тестування	Результати для Penicillum funicolosum
Целюлоза (DNS CMC спосіб згідно з процедурою 1.1), pH 5,0	3,140
Целобіогідролаза (використання п-нітрофеніл-В-D-целобіопіранозиду згідно з процедурою 1.2), pH 5,0	0,022
В-глюкозидаза (використання п-нітрофеніл-В-D-глюкопіранозиду згідно з процедурою 1.3), pH 5,0	0,157
Ендо-1,3(4)-В-глюканаза (використання DNS та В-глюкану ячменя згідно з процедурою 1.4), pH 5,0	7,230
Ендо-1,3(4)-В-глюканаза (використання В-глюкану азо-ячменя згідно з процедурою 1.5), pH 4,6	1+/-
Ламінариназа (використання DNS і ламінарину згідно з процедурою 1.6), pH 5,0	0,300
Ендо-1,4-В-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7), pH 3,5	9,160
Ендо-1,4-В-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8), pH 3,5	8,670
Ендо-1,4-В-ксиланаза (віскозиметричний спосіб арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.9), pH 5,5	9,890
В-ксилозидаза (використання п-нітрофоніл-В-D-ксилопіранозиду згідно з процедурою 1.10), pH 5,0	0,0047
α-N-арабінофуранозидаза (використанням п-нітрофеніл- α-L-арабінофуранозиду згідно з процедурою 1.11), pH 5,0	0,0017
Ферулоїл-естераза (FAXX метод згідно з процедурою 1.12)	0,000254
Ферулоїл-естераза (Ara_2F метод згідно з процедурою 1.13)	0,000349
Ферулоїл-естераза (MFA спектрофотометричний спосіб згідно з процедурою 1.14)	0,000135
Ферулоїл-естераза (MCA спектрофотометричний спосіб згідно з процедурою 1.14)	0,000174
Ферулоїл-естераза (MSA спектрофотометричний спосіб згідно з процедурою 1.14)	0,000049
Ферулоїл-естераза (MpCA спектрофотометричний спосіб згідно з процедурою 1.14)	0,000216

UA 77381 C2

3.1 Способи очищення

Хроматографія гідрофобних взаємодій

Препарати, отримані після фільтрації і концентрування ферментаційного середовища до концентрації білку 112,6мг/мл, розводять 1/1 буфером для хроматографії гідрофобних взаємодій (HIC) (50мМ фосфатний буфер, pH 7,0 / 1,7M $(NH_4)_2SO_4$ / 0,04% азид натрію), заміняють на HIC буфер (PD-10 колонки; Pharmacia). Порції (по 10мл) високоефективного HIC гелю (Pharmacia) вводят в колонку (діаметр 10х5см, 200мл) PhenylSepharoes™, і розділяють, використовуючи градієнт сульфату амонію $(NH_4)_2SO_4$ із концентрацією, що знижується (1,7-0,0M) за 10хв. Фракції (по 10мл) збирають і аналізують на активність ксиланази.

HIC дає два основних піки активності ксиланази. Перший, названий A, елюється з колонки, коли концентрація $(NH_4)_2SO_4$ знижується до приблизно 0,6M, тоді як другий, названий B, елюється при концентрації $(NH_4)_2SO_4$ приблизно 0,25M. Фракції, що містять піки A та B, із кожного введення збирають окремо. Повна фракція A відповідає 2,8% від повної активності ксиланази, тоді як фракція B відповідає 97,2% від повної активності ксиланази. Вихід складає 77%.

Іонообмінна хроматографія

Об'єднані фракції піків A и B із HIC осаджують, підвищуючи концентрацію $(NH_4)_2SO_4$ до 100% насичення з наступним центрифугуванням (10000xg протягом 30 хв.). Осади знову розчиняють у суміші 20мл Tris-HCl буфера, pH 8,0 / 0,04% азид натрію та знесолюють до того ж самого буфера, використовуючи PD-10 колонку. Зразки (5мл) вводять у MonoQ ™ HR 10/10 аніонообмінну колонку (Pharmacia), попередньо урівноважену сумішшю 20мМ Tris-HCl буферу pH 8,0 / 0,04% азид натрію, і елюють із швидкістю 2мл/хв. із концентрацією хлориду натрію NaCl (0-1M), що підвищується в тому ж самому буфері. Фракції (2мл) збирають і аналізують на активність ксиланази.

Пік A

Виділення піка A за допомогою аніонообмінної хроматографії призводить до одержання одного піку активності ксиланази, який елюють при приблизно 0,3M NaCl. Найбільш активні фракції збирають і аналізують за допомогою SDS-PAGE (гель-електрофорез у натрійдодецилсульфат-поліакриламіді). Одержують одну основну смугу з молекулярною масою 48кДа. Виділення активності ксиланази після IEF (ізоелектричне фокусування підтверджує, що ця основна Coomassie-пофарбована смуга є ксиланазою.

Пік B

Виділення піку B за допомогою аніонообмінної хроматографії дає два основних піки активності ксиланази, один із яких елюється в піці матеріалу, що не сорбується (незв'язаний матеріал; пік B-I), а інший - при 0,1M NaCl (пік B-II). Присутні також два невеликих піки, що елюються при 0,13M і 0,19M NaCl. Активні фракції, що відповідають кожному піку, збирають і аналізують за допомогою SDS-PAGE, але жодний із зразків не є чистим.

Гель-фільтраційна хроматографія

Об'єднані фракції, що містять B-I і B-II, сушать виморожуванням, знову розчиняють у воді й знесолюють (використовуючи PD-10 колонки). Зразки (0,2мл) вводять у Superdex ™ 75 HR колонку (Pharmacia) і елюють при швидкості 0,4мл/хв. буфером 20мМ Bis-Tris, pH 6,0 / 0,2M NaCl / 0,04% азид натрію. Фракції (0,4мл) збирають і аналізують на ксиланазну активність.

3.2. Характеристики ксиланаз

3.2.1. Визначення ізоелектричної точки за допомогою ізоелектричного фокусування

Ізоелектричні точки білків визначають стандартними способами, використовуючи попередньо відлиті вертикальні 5% поліакриламідні гелі від NOVEX® для pH 3-10 і pH 3-7. Використовують NOVEX® катод, анод і IEF зразкові буфери, і стандартні протоколи для ізоелектричного фокусування, фіксації, фарбування Coomassie R-250 Blue барвником, і знебарвлення.

Для ксиланази A використовують зразок після MonoQ.

Для ксиланаз B-I і B-II використовують зразок після HIC, ксиланазу B. Для кожного з A і B невеликий зразок (10мкл) поміщають в окрему комірку, і великий зразок (50мкл) поміщають у потрійну комірку. Після фокусування зразків гель розрізають на дві частини так, що одна частина містить два невеликих зразки (A+B) і маркери молекулярної ваги (ця половина пофарбована Coomassie), тоді як інша частина містить два великих зразки. Частину гелю, що містить великі зразки, розрізають так, щоб розділити смуги двох зразків, а потім кожну зі смуг розділяють на ділянки по 2мм. Кожну із 2мм ділянок вимочують окремо протягом ночі в 100мМ MOPS буфері, pH 6,0 / 0,04% азид натрію. Фракції аналізують на активність ксиланази.

Для зразка A ксиланази пофарбований IEF гель демонструє одну основну смугу pI 3,55 маркера і декілька невеликих примісних смуг. Ксиланазна активність виявлена тільки у фракції, що відповідає цій смузі, підтверджуючи, що основний пік відповідає ксиланазі.

Для зразка B пофарбований IEF гель демонструє декілька смуг в інтервалі значень pI. Ксиланазна активність мала місце в двох розділених фракціях непофарбованого гелю і відповідає білкам із pI 4,2 і 4,8.

3.2.2. Визначення молекулярної маси за допомогою SDS-PAGE

Для підтвердження молекулярних мас ксиланаз у піку B з HIC фракції з ксиланазною активністю, елюйованої з IEF гелю, знесолюють, сушать виморожуванням і розділяють за допомогою SDS-PAGE. Денатурування PAGE здійснюють, використовуючи 10% Tris-гліциновий гель (NOVEX®) із дітіотреїтолом (DTT 50 мМ), включеним в зразковий буфер як відновлювальний агент.

Пофарбований гель показує, що обидві ксиланази виявилися чистими, з молекулярними масами 36кДа і 15кДа для ксиланази B-I і B-II, відповідно.

Усі три очищені ксиланази аналізують за допомогою SDS-PAGE: фракцію ксиланази A після аніонообмінної хроматографічної обробки, фракції ксиланази B-I і B-II після гельфільтраційної хроматографічної обробки.

Ксиланаза А дає одну смугу з молекулярною масою 48кДа. Ксиланаза В-І дає одну основну і чотири невеликі смуги після фарбування Coomassie. Підтверджується, що основна смуга відповідає ксиланазі, тому що її молекулярна маса дорівнює 36кДа. Ступінь чистоти оцінюють як 90%. Ксиланаза В-ІІ дає основну смугу з молекулярною масою 15кДа і 2-3 невеликі смуги. Ступінь чистоти цієї ксиланази приблизно 95%. Результати представлені у табл. 6.

Таблиця 6

Результати визначення молекулярної маси ксиланази за допомогою SDS-PAGE

Зразок	Молекулярна маса, кДа	pI
Ксиланаза А	48	3,55
Ксиланаза В-І	36	4,20
Ксиланаза В-ІІ	15	4,80

Тести по вимірюванню активності ферментів були описані вище.

3.2.3.1. Аналіз ксиланази А

[Білок] 0,4мг/мл. Результати наведені у табл. 7 і 8.

Таблиця 7

Результати активності ксиланази А залежно від різноманітних субстратів

Методи, використані під час тестування	pH	Активність ферменту	
		од./мл.	од./(мг білку)
Целюлоза (DNS CMC спосіб згідно з процедурою 1.1)	5,0	<1,0	н/п*)
Целобіогідролаза (використання п-нітрофеніл-B-D-целобіопіранозиду згідно з процедурою 1.2)	5,0	<1,0	н/п
Ендо-1,3(4)-B-глюканаза (використання DNS та B-глюкану ячменя згідно з процедурою 1.4)	5,0	<1,0	н/п
Ламінариназа (використання DNS і ламінарину згідно з процедурою 1.6)	5,0	н/в*)	н/п
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	5,5	140	350
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	3,5	158	395
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8)	5,5	152	380
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8)	3,5	171	429
Ендо-1,4-B-ксиланаза (віскозиметричний спосіб арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.9)	5,5	456	1140

Примітка: - *) н/в – не визначали, н/п – не придатне.

Таблиця 8

Вплив pH на ферментативну активність ксиланази відносно ксилану деревини берези

pH	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
2,0	294	73
3,0	353	87
3,5	385	95
4,0	405	100
5,0	345	85
5,5	340	84
6,0	302	75
7,0	212	52

3.2.3.2. Аналіз ксиланази В-І

[Білок] 0,096мг/мл. Результати наведені у табл. 9 і 10.

Таблиця 9

Результати активності ксиланази В-І залежно від різноманітних субстратів

Методи, використані під час тестування	pH	Активність ферменту	
		од./мл.	од./(мг білку)
Целюлоза (DNS CMC спосіб згідно з процедурою 1.1)	5,0	26,5	
Целобіогідролаза (використання п-нітрофеніл-B-D-целобіопіранозиду згідно з процедурою 1.2)	5,0	0,541	276
Ендо-1,3(4)-B-глюканаза (використання DNS та B-глюкану ячменя згідно з процедурою 1.4)	5,0	73,8	5,6
Ламінариназа (використання DNS і ламінарину згідно з процедурою 1.6)	5,0	<0,1	769
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	5,5	51,3	н/п*)
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	3,5	83,6	534
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8)	5,5	93,2	871
Ендо-1,4-B-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8)	3,5	143,8	971

UA 77381 C2

Ендо-1,4-В-ксиланаза (віскозиметричний спосіб арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.9)	5,5	147	1531
Примітка: - *) н/п – не придатне.			

Таблиця 10

Вплив pH на ферментативну активність ксиланази відносно ксилану деревини берези

pH	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
2,0	610	70
3,0	755	87
3,5	871	100
4,0	802	92
5,0	567	65
5,5	534	61
6,0	481	55
7,0	404	46

3.2.3.3. Аналіз ксиланази В-ІІ

[Білок] 0,165мг/мл. Результати наведені у табл. 11 і 12.

Таблиця 11

Результати активності ксиланази В-ІІ залежно від різноманітних субстратів

Методи, використані під час тестування	pH	Активність ферменту	
		од./мл.	од./(мг білку)
Целюлоза (DNS CMC спосіб згідно з процедурою 1.1)	5,0	<1,0	н/п*)
Целобіогідролаза (використання п-нітрофеніл-В-D-целобіопіранозиду згідно з процедурою 1.2)	5,0	<1,0	н/п
Ендо-1,3(4)-В-глюканаза (використання DNS та В-глюкану ячменя згідно з процедурою 1.4)	5,0	<1,0	н/п
Ламінариназа (використання DNS і ламінарину згідно з процедурою 1.6)	5,0	н/в*)	н/п
Ендо-1,4-В-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	5,5	141,9	860
Ендо-1,4-В-ксиланаза (використання DNS та ксилану деревини берези згідно з процедурою 1.7)	3,5	281,0	1582
Ендо-1,4-В-ксиланаза (використанням DNS та арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.8)	5,5	152,6	925
Ендо-1,4-В-ксиланаза (віскозиметричний спосіб арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.9)	3,5	267,9	1624
Ендо-1,4-В-ксиланаза (віскозиметричний спосіб арабіноксилану пшениці згідно з процедурою 1.9)	5,5	262	1588
Примітка: - *) н/в – не визначали, н/п – не придатне.			

Таблиця 12

Вплив pH на ферментативну активність ксиланази відносно ксилану деревини берези

pH	Активність	
	(міжнарод. од.)/хв.	%
2,0	1374	84
3,0	1523	93
3,5	1582	97
4,0	1630	100
5,0	1093	67
5,5	860	53
6,0	443	27
7,0	156	10

3.2.4. Послідовності

Один із варіантів даного винаходу відноситься до послідовностей амінокислот і нуклеїнових кислот для описаних вище білків або їхніх варіантів.

Для цієї мети послідовності ксиланаз ідентифікують за амінокислотними послідовностями очищених білків (ксиланаза А, ксиланаза В-І і ксиланаза В-ІІ) і при порівнянні послідовностей амінокислот і нуклеотидів із послідовностями відомих грибкових ксиланаз.

Слід розуміти, що в рамках даного винаходу термін “варіанти” відноситься до будь-якого поліпептиду або будь-якого аналогу білку фрагменту білку, похідного або білку-мутанту з нативного білку або поліпептиду і який має ті ж самі біологічні функції, що і зазначений нативний білок або поліпептид. У природному стані можуть існувати різноманітні варіанти. Такими варіантами можуть бути, наприклад, алельні варіанти, що характеризуються відмінностями в послідовності генів, які кодують зазначений білок, або можуть бути результатом диференційного сплайсінгу або пост-трансдукціних модифікацій. Варіанти можна одержати шляхом

UA 77381 C2

заміщення, делеції, додавання і/або модифікації однієї або більше з амінокислот. Всі модифікації добре відомі і їх можна здійснити будь-якими відомими спеціалістам способами.

Варіантами є молекули, що мають, наприклад, велику спорідненість до їх субстрату; або які мають нові біологічні властивості.

Іншою метою даного винаходу є також застосування послідовностей для експресії описаних білків або поліпептидів у клітинах-хазяїнах одноклітинних або багатоклітинних організмів. Для цієї мети зазначені послідовності можуть бути введені в геном вектору. Зазначеним вектором може бути плазміда. фаг або вірус. Тому іншим варіантом даного винаходу є клітина-хазяїн, виділена з одноклітинного або багатоклітинного організму, трансфікована або інфікована вектором, як описано вище. У кращому варіанті клітиною-хазяїном є бактерія.

Іншим варіантом даного винаходу є застосування зазначених векторів, що включають послідовність нуклеїнових кислот описаних вище білків для експресії зазначеного білку в будь-яку клітину-хазяїна.

3.2.4.1 Послідовності ксиланази С

Створення зондів базується на порівняннях амінокислотних і нуклеотидних послідовностей відомих грибкових ксиланаз. Визначають консервативні ділянки і використовують для створення ПЛР праймерів, продукти яких можна було б використовувати для скринування геномної бібліотеки Penicillum funicolosum.

Створюють дві пари дегенерованих праймерів. Першу пару створюють для ампліфікації 200п.о. (приблизно) продукту з гену ксилазы типу В (або типу 2). Другу пару створюють для ампліфікації 250п.о. продукту з гену ксиланази типу А (тип 1).

Полосу 258п.о. одержують с праймерами 3 і 4. Після клонування в pGEMT і секвенування було виявлено, що наявна значна схожість послідовності з послідовністю грибкової ксиланази типу А/1. Плазміду, що містить клонований продукт, називають pPFXYLA.

Повна послідовність ксиланази С представлена на фіг. 1 і в послідовності з ідентифікаційним № 1 (послідовність з ідент. №1).

3.2.4.2 Послідовності ксиланази В-І

Для конструювання дегенеративних ПЛР праймерів (послідовність з ідент. №2 і №3) використовують внутрішню амінокислотну послідовність поряд із порівняннями послідовностей інших грибкових целобіогідролаз. Продукт 290п.о. (послідовність з ідент. №4) ампліфікують і клонують в pGEMT (Promega) для створення pGEMTCB2, і секвенують. На фіг. 2 видно, що праймерні послідовності підкреслені. Цей продукт ПЛР в даний час застосовують як зонд для скринування геномної бібліотеки Penicillum funicolosum IMI134756.

3.2.4.3. Послідовність ксиланази В-ІІ

Вся послідовність гену ксиланази В-ІІ включає 1,3кп.о. 5' нетрансльованої і розташованої у зворотному напрямку ділянки і 0,85кп.о. 3' нетрансльованої ділянки, 54п.о. інтрон і 669п.о., які кодують білок з 223 амінокислот.

Для доказу існування 54п.о. інтрону використовують ПЛР із зворотною транскриптазою (RT-PCR). Повну РНК виділяють із міцелію культур Penicillum funicolosum IMI134756, зібраних після 4 днів вирощування на 1% (мас./об.) ксилані вівса. Конструюють праймери для ампліфікації аж до 195п.о. фрагменту з інформаційної РНК (249п.о. з геномної ДНК) і до 433п.о. (487п.о. з геномної ДНК).

Секвенування 3кп.о. із 3'кінця плазміди (pPFXYNC2) виявило ген (позначений per A), що містить два передбачуваних інтрони, і кодує поліпептид, який складається приблизно з 570 амінокислот. Цей поліпептид демонструє значну схожість послідовності із амінокислотними пермеазами грибків.

3.2.4.4. Послідовність ксиланази А

Була отримана внутрішня послідовність ксиланази А, вона представлена такою послідовністю амінокислот: AEAINYNQDY

3.3 Властивості ферулоїл-естераз

3.3.1. Очищення

Здійснюють таким же способом, що і для ксиланаз.

Суміш ферментів містить, принаймні, дві різні ферулоїл-естерази. У однієї з них (FaeB) молекулярна маса за даними мас-спектрометрії складає 38945-41051Да (35450Да з первинної амінокислотної послідовності та 37кДа за даними SDS-PAGE). FaeB має значення pI 4,2, що відповідає ферулоїл-естеразі типу В и є специфічним для MpCA, і Ara_2F субстратів (активність по відношенню до MpCA, MCA, MFA і Ara_2F; але не по відношенню до MSA і FAXX).

У іншої ферулоїл-естерази (FaeA) молекулярна маса складає 29кДа (за даними SDS-PAGE). FaeA має значення pI 4,65, що відповідає ферулоїл-естеразі типу А, і є специфічним для FAXX і MSA субстратів (активності по відношенню до MSA, MCA, MFA і FAXX, але не по відношенню до MpCA Ara_2F).

3.3.2. Визначення ізоелектричної точки за допомогою ізоелектричного фокусування

Ізоелектричні точки білків визначають стандартними способами. Суміш ферментів наносять у вигляді широкої смужки (коло 20мм) в IEF гель та здійснюють електрофорез при зниженій температурі (5°С). Після фокусування і звуження смуги гель розрізають по середині смуги зразка. Одну частину смуги зразка і IEF стандарти фіксують, забарвлюють і знесолюють, використовуючи стандартний протокол. Іншу частину смуги нарізають на ділянки шириною 2мм в і кожну ділянку вимочують протягом ночі в 1мл 100мМ МОРБбуферу, pH 6,0. Активність ферулоїл-естерази визначають для кожної ділянки гелю, використовуючи MFA, MpCA і MSA як субстрати.

Пофарбований IEF гель демонструє наявність дуже багатьох білків у целюлазі, pI значення для який варіюються в інтервалі від дуже кислотних (pI 2,4) до приблизно pI 7. Більшість білків є кислотними (інтервал pI 2,4-5). Два піки ферулоїл-естеразної активності виявляють у фракціях, вирізаних із гелю. Один, що

відповідає FaeB, має значення pI 4,2 і активність тільки по відношенню до MFA і MpCA (але не MSA). Інший, що відповідає FaeA, має значення pI 4,65 і активність відносно всіх трьох тестованих субстратів.

3.3.3 Молекулярна маса, визначена за допомогою SDS-PAGE

Молекулярні маси визначають за допомогою SDS-PAGE, використовуючи 10% Tris-гліцинові гелі. Одержують SDS-PAGE гелі, фіксують, забарвлюють Coomassie Blue барвником і знесолюють, використовуючи стандартний протокол.

Суміш ферментів містить, принаймні, дві різноманітні ферулоїл-естерази. В однієї з них, що відповідає FaeB (pI 4,2), молекулярна маса складає 37кДа. В іншій, що відповідає FaeA (pI 4,65), молекулярна маса складає 29кДа.

Молекулярну масу FaeB оцінюють як 34450Да з первинної амінокислотної послідовності і як 38945-41051Да за даними мас-спектрометрії.

3.3.4. Активність ферулоїл-естерази

Аналіз на активність ферулоїл-естераз здійснюють на суміші ферментів (табл. 13), використовуючи спектрофотометричний метод.

Таблиця 13

Результати активності ферулоїл-естераз залежно від різноманітних субстратів

Методи, використані під час тестування	Активність	
	од./мл.	од./(г білку)
Метил фурулат MFA (0,1м)	0,086	7,9
Метил кофеат MCA (0,1м)	0,111	10,3
Метил синапат MSA (0,1м)	0,031	2,9
Метил р-кумарат MpCA (0,1м)	0,138	12,7
FAXX (0,05м)	0,162	15,0
$Aга_2F$ (0,05м)	0,222	20,6

Суміш ферментів містить активності проти всіх тестованих субстратів. Для метилес-тераз найвищою активністю є активність відносно MpCA, а самою низькою - відносно MSA.

Активності відносно АгагР і FAXX вище, ніж відносно метилестераз, що є показником того, що активності естераз зв'язані з істинними ферулоїл-естеразами, а не із загальними естеразами або побічними активностями інших руйнуючих стінки клітин естераз (наприклад, ацетил-ксилан-естераза, пектин-естераза).

3.3.5. Послідовності

3.3.5.1 Послідовність FEA-A

Відповідно до розщеплення очищених білків одержують внутрішні амінокислотні послідовності як:

Послідовність 1

QYTLTLPSNYNPNK

Послідовність 2

AVAVMSGANL

Послідовність 3

TEYSG (C/A) DSEHPVWWIAFDGP

Послідовність 4

DTFVKDDHCTPTNPPAPAAGSGTHIKYV

Конструюють декілька дегенеративних ПЛР праймерів з амінокислотних послідовностей, отриманих з очищеного білку. Багато з продуктів були клоновані в pGEMT (Promega) і секвеновані.

За допомогою ПЛР було виявлено, що плазміда, названа pGEMTD19 (180п.о.) (фіг. 3 містить послідовність, що розпізнається як пептидна послідовність 4, представлена вище. Я показано на фіг. 3, праймерні послідовності підкреслені двічі, а раніше відома послідовність підкреслена ще один раз.

Послідовності нуклеїнової кислоти і амінокислот FAE-A подані в послідовності з ідент. №5.

3.3.5.2. Послідовність FEA-B

Праймери, сконструйовані із пептидної послідовності FAE-B, використовують для посилення зонду, який потім використовують для скринування геномної бібліотеки Penicillum funicolosum. Клон 229п.о. виділяють і секвенують (послідовність з ідент. №6). Ген, що кодує поліпептид із 304 амінокислот, має один передбачуваний інтрон. Передбачена амінокислотна послідовність представлена на фіг. 4, де зрілий білок (довжина зрілого білку =338) зображений жирним шрифтом. Цей білок включає два різних домени, розділені в сильному ступені глікозилірованим лінкером. Як показано на фіг. 4, каталітичний домен зображений жирним шрифтом, тоді як зв'язуючий домен зображений жирним шрифтом і підкреслений двічі, а лінкер представлений точечною жирною лінією.

Білок також відрізняється передбачуваним фрагментом активного сайта (серин=нуклеофіл), що показано підкресленням на фіг. 4, із такими передбаченими каталітичними тріадами:

(1) S136/D174/H216

(2) S136/D220/H276.

FAE-B білок включає також послідовність секреції (353) і 10 цистеїнів.

3.4 Властивості глюканаз

Суміш ферментів обробляють за допомогою 2D гель-електрофорезу. IEF здійснюють, використовуючи

попередньо відлиті вертикальні 5% поліакриламідні гели від NOVEX® для pH 3-7 (інтервал pI 3,0-6,5) у міні-комірці NOVEX® XCell II™ Mini-Cell. Використовують NOVEX® катод, анод і IEF зразкові буфери для pH 3-7, а також стандартний протокол NOVEX® для ізоелектричного фокусування. Одну смугу відрізають, і обробляють електрофоретично в другому напрямку, використовуючи 10% Laemmli SDS-PAGE гель. З гелю виділяють другу смугу, розрізають на 35 фракцій, смужки гелю вимочують у буфері, і фракції аналізують на активність ферменту. Третю смугу лишають на гелі, фіксують, фарбують Coomassie R-250 Blue барвником і знесолюють, використовуючи NOVEX® стандартний протокол.

Значні активності ендо-1,3(4)-В-глюканази (спосіб DNS і В-глюкану ячменя) і целюлази (спосіб DNS і CMC) виявлені у фракціях, що відповідають білкам із pI 4,2, молекулярною масою 36кДа і pI 5,4, молекулярною масою 27кДа. Для видалення ксиланази 6-1, що перебуває в одній з фракцій, фракції тестують на активність, використовуючи спосіб DNS і ксилану деревини берези. У фракціях, що відповідають активностям В-глюканази або целюлази, активність ксиланази не виявлена.

Список малюнків

Фіг.1 - амінокислотна послідовність білку ксиланази С Penicillum funiculosum.

Фіг.2 - нуклеотидна і амінокислотна послідовності продукту ПЛР ксиланази В-І (XynBI).

Фіг.3 - нуклеотидна і амінокислотна послідовності ПЛР продукту ферулоїл-естерази А (faeA).

Фіг.4 - Амінокислотна послідовність білку (FAE-V. або FAE-I) ферулоїл-естерази В (fae) Penicillum funiculosum.

Е. Застосування суміші ферментів у кормах для тварин

Приклад 1: Оцінка ефективності препарату ферментів, продукованих Penicillum funiculosum відносно енергетичної цінності (AME_N) корму із суміші пшениці і ячменя для бройлерів

Метою було продемонструвати ефективність ферментів (активність В-глюканази: 100од./кг і активність ксиланази: 1100од./кг) на гадану обмінну енергію, скориговану за азотним балансом (AME_N) корму, що містить 50% пшениці і 22% ячменя.

Експерименти проводили за допомогою контрольних і ферментних препаратів (активність В-глюканази: 100од./кг і активність ксиланази: 1100од./кг), використовуючи Європейський метод порівняння [Bourdillon et al. European reference method for the in vivo determination of metabolizable energy with adult cockerels: reproductibility, effect of age, comparison with predicted values // British Poultry Science. – 1990. – 31. – P. - 567-576] під час годівлі досхочу і повному зборі екскрету для віку між 18 і 21 днем.

а. Матеріали і методи

Птахи: Порода й умови вирощування

Одноденних півників бройлерів Ross утримують в клітинах колективної батареї до віку 12 днів. їм дають стандартний початковий корм. На 12-й день птахів зважують і рівномірно розподіляють на 10 окремих клітин для кожної обробки, а потім їм дають експериментальний корм протягом періоду адаптації (мінімум 5 днів).

Підтримують стандартну температуру і вологість. Постійний світловий режим складає: 23 години світла і 1 годину темноти до кінця випробувань.

Корми: Птахи одержують початковий корм з одного дня життя до 12 днів, а потім одержують експериментальний корм.

Експериментальні корми

Корми містять пшеницю і ячмінь у співвідношенні, %

пшениця	50;
ячмінь	22;
мука канола	8;
пташина мука	5;
соєва мука	5;
м'ясна мука	5;
жир	3;
вітаміни / мінерали	2.

Ферментний препарат розпорошують на 20кг зерна. Характеристики експериментальних кормів наведені у табл. 14.

Таблиця 14

Характеристики експериментальних кормів

Зразок	Характеристики кормів, %		
	DM	сирий білок	жир
Контроль	89,7	20,8	5,4
Ферменти	89,6	20,7	5,6

Відновлення ферментів в кормах вимірюють віскозиметрично [Sabatier A.M., Fish N.M. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems // Journal of Applied Poultry Research. - 1996. – 5. – P. 408-413].

Вимір обмінної енергії

Баланс починають визначати з 18 дня (Д 18) у такий спосіб:

Д 17 - птахам не дають корму протягом ночі;

Д 18 - птахів зважують, очищають складальні лотки;

Д 19 - фекалії збирають і заморожують;

Д 20 - фекалії збирають і заморожують, уночі не дають корму;

Д 21 - фекалії збирають і заморожують, птахів зважують і знову годують.

Фекалії сушать виморожуванням і подрібнюють як корм (1мм, подрібнювач Retsch). Загальну енергію корму і екскрету визначають за допомогою адіабатичного колориметра IKA C5000. Також визначають вміст білків (N*6,25, Kjeldahl метод Z130) і ліпідів (метод Z160). Коригування за азотним балансом вводять, використовуючи 18% білок у збільшенні маси.

b. Результати та обговорення

Очевидна обмінна енергія, скоригована за азотним балансом (AME_N)

Зоотехнічні характеристики і величини обмінної енергії представлені в табл. 15

Таблиця 15

Вплив препарату ферментів, продукованих Penicillum funiculosum, на характеристики росту і очевидну обмінну енергію для бройлерів, що одержують експериментальний корм на основі пшениці і ячменя

Показник	Зразок	
	контроль	ферменти
Повна енергія корму, ккал/кг DM	4609	4651
Збільшення маси тіла, г	156±19,8	154±22,3
Споживаний корм, г/день	104±15,8	99,7±10,1
FCR, г/г	1,99±0,11	1,95±0,17
Фекалії DM, %	34,7±3,7	35,6±8,3
AME_N, ккал/кг DM	3252±80	3456±62
AME_N, ккал/кг DM	2913 [a]±71,9	30951 [b]±55

Між обробками немає розходжень у зоотехнічних характеристиках.

При вирощуванні бройлерів ферментний препарат підвищує (AME_N) корму на основі 50% пшениці і 22% ячменя на 6,2% (+204ккал/кг DM (Сухої Речовини)).

Більш того, варіабельність енергетичної засвоюваності була знижена з 80 до 62ккал/кг DM.

Настільки значне збільшення демонструє користь обох активностей (ксиланази і В-глюканази), продукованих Penicillum funicolosum відносно гідролізу розчинних не крохмалистих полісахаридів пшениці і ячменя.

Приклад 2: Вплив препарату ферментів, продукованих Penicillum funiculosum, на засвоюваність корму бройлерами, що одержують як корм пшеницю

Проводять випробування з метою визначити вплив препарату ферментів, продукованих Penicillum funiculosum (активність В-глюканази; 100од./кг і активність ксиланази: 1100од./кг) на очевидну обмінну енергію (AME), на засвоюваність білків і ліпідів бройлерами, що одержують корм, який містить 54% пшениці. Досліджують також залежність від ступеню здрібнювання корму.

(1) Контроль 1 (54% здрібненої пшениці).

(2) Контроль 1 + Препарат ферментів (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг).

(3) Контроль 2 (30% цілих зерен пшениці, 24% здрібнених зерен пшениці).

(4) Контроль 2 + Препарат ферментів (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг).

Відповідно до Європейського способу порівняння (корм ad libitum і повний збір екскрету для віку з 18 до 21 дня) [Bourdillon A. et al. European reference method for the in vivo determination of metabolizable energy with adult cockerels: reproductibility, effect of age, comparison with predicted values // British Poultry Science. – 1990. – 31. P. - 567-576].

а. Матеріали і методи

Птиця: Порода й умови вирощування

Одноденних півників бройлерів Ross утримують у клітинах колективної батареї до віку 12 днів. Потім їх переводять в індивідуальні клітини для визначення балансу засвоюваності.

Підтримують стандартну температуру і вологість. Постійний світловий режим складає: 23год. світла і 1год. темноти до 8-денного віку. Потім світловий режим змінюють на 15год. 30хв. світла і 8год. 30хв. темноти через випробування, які проводяться в тому ж приміщенні.

Корми: Птахи одержують стандартний початковий корм до 12-денного віку, а потім одержують експериментальні корми.

Експериментальні корми

Корми містять 54% пшениці, що характеризується, %:

суха речовина	86,2;
сирий білок	10,87;
ліпіди	1,65;
В-глюкани	0,77;
пентозани	6,8;
відносна в'язкість при pH 4,5, мПа·с	1,34;

відносна в'язкість при pH 1,5, мПа·с 1,29.

Склад корму поданий у табл. 16, а його характеристики у табл. 17.

Таблиця 16

Склад експериментальних кормів на основі пшениці

Інгредієнт	Вміст, %	
	Здрібнена пшениця	Ціла пшениця
Здрібнена пшениця	53,84	23,84
Ціла пшениця	-	30,0
Тваринні жири	3,52	3,52
Соєва мука (48%)	18,26	18,26
М'ясна і кісткова мука	5,64	5,64
Горох	7,0	7,0
Ціле зерно рапсу	10,0	10,0
Вітаміни /мінерали	1,74	1,74

Таблиця 17

Характеристика експериментальних кормів на основі пшениці

Встановлена поживна цінність, %	Зразок корму	
	Здрібнена пшениця *)	Ціла пшениця **)
Білок	20,6	20,5
Жир	9,6	9,6
Лізин	1,05	1,04
Метіонін	0,45	0,45
Met+Cyz	0,85	0,85
Кальцій	0,90	0,90
Доступний фосфор, %	0,35	0,35

Примітки:
*) Обмінна енергія – 3173ккал/кг.
**) Обмінна енергія – 3188ккал/кг.

2.2. Вимір очевидної обмінної енергії

Баланс починають визначати з 17-го дня за такою схемою:

Д 17 - птахам не дають корму протягом ночі;

Д 18 - птахів зважують, очищають складальні.лотки;

Д 19 - фекалії збирають і заморожують;

Д 20 - фекалії збирають і заморожують, уночі не дають корму;

Д 21 - фекалії збирають і заморожують, птахів зважують і знову годують.

Фекалії сушать виморожуванням і подрібнюють як корм (1мм, подрібнювач Retsch). Загальну енергію корму і екскрету визначають за допомогою адіабатичного колориметра IKA C5000. Визначають також вміст білків (N*6,25, Kjeidahl метод Z130 для кормів і Z135 для фекалій) і ліпідів (метод Z160).

Склад амінокислот також визначають, використовуючи BEPX (метод Z100 для кормів і Z080 для фекалій). Вміст фосфору в кормах і екскретах визначають, використовуючи AFNOR метод (NFV18-106).

b. Результаты й обговорення

Очевидна обмінна енергія (AME)

Характеристики росту і дані про обмінну енергію представлені в табл. 18.

Таблиця 18

Вплив препарату ферментів (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг) на AME_N кормів на основі пшениці (54% здрібнених або 24% здрібнених і 30% цілих зерен) для зростаючих бройлерів

Показник	Зразок корму на основі пшениці			
	Здрібнені зерна	Суміш здрібнених зерен і ферментів	Цілі зерна	Суміш цілих зерен і ферментів
Збільшення маси тіла, г	172±11,8	170±13,1	167±8,9	165±12,0
Споживаний корм, г	282±20,5	272±17,2	274±15,5	267±14,0
Споживаний корм, г/день	94±6,8	91±5,7	91±5,2	89±4,7
Показник перетворення корму (FCR 3), г/г	1,64±0,05	1,60±0,06	1,64±0,05	1,63±0,09
Очевидна засвоюваність білків, %	83,8±1,08 a	85,9±1,14 b	86,5±0,77 bc	87,0±0,80 c

Очевидна засвоюваність ліпідів, %	82,2±2,55	88,0±2,10 bc	86,6±2,45 b, bc	89,2±1,25 c
AME_N, ккал/кг DM	3577±76 a	3699±85 b	3678±35 b	3779±34 c
AME_N, ккал/кг	3194±67	3303±76	3284±31	3375±31

Примітки:
1. Одинарний спосіб аналізу відхилень, ефект корму, н=47; а, Ь: значення з однаковими верхніми індексами не відрізняються при р <0,05.
2. Подвійний спосіб аналізу відхилень, н=47 (пшениця: 54% здрібненої або 24% здрібнених + 30% цілих зерен пшениці; фермент; з 0,21/t ксилану або без нього.
3. FCR - показник перетворення корму, (г корму)/(г збільшення маси)

Характеристики (збільшення маси, споживання корму), що вимірюються протягом триденного періоду, не відрізняються для обробок. AME контрольного корму, що містить 54% здрібненої пшениці, складає 3173ккал/кг. Обмінна енергія корму, що містить ту ж саму кількість пшениці, але 30% якого складають цілі зерна, підвищується на 100ккал/кг у порівнянні з теоретичним значенням. Більше того, варіабельність, оцінена за стандартним обмірюванням різноманітних критеріїв, також зменшується під час використання цілих зерен пшениці.

Ферменти, продуковані Penicillum funiculosum (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг) підвищують величину обмінної енергії для корму на основі 54% пшениці на +3,4% (122ккал/кг DM), якщо пшениця здрібнена, і на +2,7% (101ккал/кг DM), якщо 30% пшениці включені у вигляді цілих зерен.

Очевидна засвоюваність живильних речовин (ліпіди, білки та амінокислоти).

Якщо здрібнена вся пшениця, очевидна засвоюваність ліпідів і білків підвищується на 7 і 2,7% відповідно, під час додавання препарату ферментів Penicillum funicolosum. Якщо частина пшениці представлена у вигляді цілих зерен, таке збільшення менше: +3% і +0,6%, відповідно, за рахунок загальної підвищеної засвоюваності живильних речовин. Дійсно, засвоюваність живильних речовин для контрольного корму, який містить цілі зерна пшениці, схожа із засвоюваністю експериментального корму, що містить тільки здрібнену пшеницю, але з добавкою препарату ферментів.

Вплив препарату ферментів на очевидну засвоюваність амінокислот показано в табл. 19.

Таблиця 19

Вплив препарату ферментів на очевидну засвоюваність амінокислот (%) корму на основі пшениці 54% для зростаючих бройлерів
(один зразок змішаного екскрети для обробки)

Показник	Зразок корму на основі пшениці			
	Здрібнена пшениця		Здрібнена і ціла пшениця	
	Темоїн	Препарат ферментів	Темоїн	Препарат ферментів
Азот	83,4	85,3	86,4	87,1
ASP	78,6	80,9	82,1	82,7
THR	74,2	75,3	78,0	79,9
SER	79,5	82,1	83,0	83,3
GLU	87,9	89,6	80,7	91,4
PRO	84,8	87,1	87,7	88,7
GLY	77,1	79,9	80,7	82,0
ALA	74,6	76,9	78,2	80,1
VAL	78,6	80,8	81,8	83,0
ILE	80,6	83,0	84,0	85,0
LEU	82,1	84,3	85,3	86,4
TYR	80,9	85,0	83,7	84,4
PHE	83,7	85,9	87,1	87,6
LYS	80,6	83,1	83,9	84,8
HIS	81,7	84,9	85,0	86,0
ARG	84,9	87,6	88,1	89,0
CYS	70,8	72,8	76,5	77,0
MET	87,2	88,5	88,5	89,4
TRP	79,5	82,4	83,3	84,7

Поліпшення під час використання препарату ферментів досягає в середньому +2,9% для здрібненої пшениці і +1,1% для пшениці у вигляді цілих зерен, що підтверджує вплив на очевидну засвоюваність білків. Очевидне утримання фосфору і екскреція фосфору

Вплив препарату ферментів на очевидне утримання фосфору поданий в табл. 20.

Таблиця 20

Вплив препарату ферментів на екскрецію фосфору і очевидне утримання фосфору для корму на основі пшениці (54% здрібненої пшениці) у зростаючих бройлерів

Показник	Корм		Ефект ферментів
	Пшениця	Пшениця - Препарат ферментів	
Очевидне утримання фосфору, %	37,9±3,0	40,5±2,8	0,047

Екскреція фосфору, р/птаха/3дн.	1,24±0,13	1,14±0,1	0,071
Екскреція фосфору, г/кг	7,2±0,5	6,7±0,5	0,034

Очевидне утримання фосфору значно підвищується під час додавання препарату ферментів: +8,0%. Таке підвищення більше, ніж те, яке спостерігається для інших живильних речовин (+2,9 до +3,5% залежно від критеріїв: АМЕ, білки, ліпіди, амінокислоти). Таке підвищення може бути результатом підвищеної засвоюваності живильних речовин (безпосередній ефект ксиланази і В-глюканази), але також і результатом посиленої дії фітази пшениці. В результаті гідролізу не крохмалистих полісахаридів ксиланаза і В-глюканаза забезпечують підвищену доступність до фітової кислоти для ендогенної фітази пшениці.

Така поліпшена засвоюваність фосфору призводить до зниження екскреції фосфору: -8%, якщо виразити в г фосфору на кг збільшення маси.

Приклад 3. Оцінка препарату ферментів відносно AME_N кормів на основі пшениці для зростаючих індичок

Метою цього експерименту є демонстрація ефективності препарату ферментів із Penicillum funicolosum (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг) відносно очевидної обмінної енергії (AME_N) кормів на основі пшениці відповідно до такої схеми експерименту:

(1) - контроль

(2) - ЕР 1: препарат ферментів (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг)

(3) - ЕР 2: препарат ферментів (активність В-глюканази 150од./кг і активність ксиланази 1650од./кг)

Відповідно до Європейського способу порівняння [Bourdillion et al., 1990] корм ad libitum і повний збір екскрету для віку з 33 до 37 дня.

а. Матеріали і методи

Птахи: Порода й умови вирощування

Одноденних індиків BUT 9 утримують у клітинах загальної батареї до віку 20 днів. Потім їх перекладають в індивідуальні клітини для визначення балансу засвоюваності після адаптаційного періоду, принаймні, в 7 днів.

Підтримують стандартну температуру і вологість. Постійний світловий режим складає: 23год. світла і 1год. темноти протягом перших двох тижнів, а потім світловий режим зменшують до 15год. світла і 9год. темноти до кінця випробувань.

Корми: Птахи одержують стандартний повний початковий корм з першого до 21 дня життя, а потім одержують експериментальні корми.

Експериментальні корми

Корми містять на основі пшениці і соєвої муки містять, %

пшениця	47,55;
екструдована соя	5,00;
м'ясна мука	6,00;
жир	4,00;
дикальційфосфат	2,30;
карбонат кальцію	0,85;
вітаміни / мінерали	1,30.

Розпилення ферментів здійснюють на 20 кг часток контрольних кормів. Характеристика кормів наведена у табл. 21.

Таблиця 21

Основні характеристики експериментальних кормів

Характеристики, %	Контроль	ЕР 1	ЕР 2
DM	89,0	89,1	88,9
Сирий білок	26,3	26,1	26,3
Жир	6,4		

Вимір обмінної енергії

На 21 день (Д 21) птахів зважують, і рівномірно розподіляють у 10 окремих клітин для кожної обробки, і дають експериментальні корми.

Баланс починають визначати з 33 дня за такою схемою:

Д 32 - птахам не дають корму протягом ночі;

Д 33 - птахів зважують, очищають складальні лотки;

Д 34 і Д 35 - фекалії збирають і заморожують;

Д 36 - фекалії збирають і заморожують, уночі не дають корму;

Д 37 - фекалії збирають і заморожують, птахів зважують і знову годують.

Фекалії сушать виморожуванням і подрібнюють як корм (1мм, подрібнювач Retsch). Загальну енергію корму і екскрету визначають за допомогою адіабатичного калориметру IKA C5000.

Величину AME_N корегують за азотним балансом, з огляду на збільшення маси тіла (г) і вміст азоту (21% сирого білку).

Фекалії сушать виморожуванням і подрібнюють як корм (1мм, подрібнювач Retsch). Загальну енергію корму і екскрету визначають за допомогою адіабатичного калориметру IKA C5000. Визначають також вміст білків

(N*6,25, Kjeidahl метод Z130 для кормів і Z135 для фекалій). Склад амінокислот також визначають, використовуючи ВЕРХ (метод Z100 для кормів і Z080 для фекалій).

b. Результати й обговорення

Очевидна обмінна енергія (AME_N)

Зоотехнічні характеристики і величини обмінної енергії показані в табл. 22.

Таблиця 22

Вплив препарату ферментів на очевидну обмінну енергію, скориговану за азотним балансом AME_N корму на основі пшениці для зростаючих індиків

Показник	Зразок корму на основі пшениці			Ймовірність *)	
	Контроль, н=12	ЕР 1, н=12	ЕР 2, н=12	ефект ферменту	ефект дози
Загальна енергія, ккал/кг DM	4659	4680	4654		
Збільшення маси тіла, г	341±23	338±36	337,5±57	NS	NS
Споживаний корм, г/день	111±5,9	107±6,3	103±12,1	NS	NS
Показник перетворення корму (FCR[3]), г/г	1,63±0,09	1,60±0,12	1,59±0,17	NS	NS
DM фекалій, %	26,1±5,5	26,5±2,2	25,9±4,8	NS	NS
AME_N, ккал/кг DM	3025±86	3092±56	3191±34	0,037	0,061
AME_N, ккал/кг	2700±77	2753±50	2840±30	0,037	0,061

Примітка: - *) Одинарний спосіб аналізу відхилень: ефект ферментів: н=60; а, Ь: означає те, що не позначене однаковими верхніми індексами, значно відрізняється при р <0,05. Ефект дози: 0, 0,2, 0,3 l/t.

В характеристиках росту немає значних розходжень при балансі між обробками.

Під час вирощування індиків ферментний препарат підвищує AMEn корму на основі пшениці на 2,2 і 5,4% для ЕР 1 і ЕР 2, відповідно.

Настільки значне спостережуване збільшення демонструє користь обох активностей (ксиланази і В-глюканази), які містяться в препараті ферментів, по відношенню до гідролізу не крохмалистих полісахаридів пшениці для збільшення енергетичної цінності цього злаку під час вирощування індиків.

Приклад 4. Оцінка впливу препарату ферментів, продукованих Penicillum funicolosum, на ефективність повного корму на основі пшениці для зростаючих свиней

Мета полягає в оцінці впливу добавок ферментів до кормів на основі пшениці на засвоюваність енергії в тонкому кишечнику зростаючих свиней. Нормальні рівні активності препарату ферментів складають 1100од./кг для ксиналази і 100од./кг для В-глюканази.

а. Матеріал та методи

Тварини

Контрольні обробки проводять у відповідності із схемою Latin square для трьох кормів і трьох періодів та двох свиней для кожного з режимів годування. Корми дають у фіксованих кількостях відповідно до маси свиней протягом періоду тестування.

Експериментальні корми

Шести зростаючим свиням дають збалансовані за рахунок інших типових кормових інгредієнтів корми на основі пшениці поганої якості, %:

пшениця	60,00;
ячмінь	9,70;
горох	11,40;
рибна мука	5,00;
мука соняшника (30)	10,00;
лізин	0,15;
вітаміни / мінерали	3,75.

Такий корм характеризувався 3150ккал/кг засвоюваної енергії і містив живильні речовини, %:

білок	14,90;
суха речовина	84,90;
волокна	5,10;
засвоюваний лізин	0,80.

Схема експерименту:

1. - Корм без добавок (основний);

2. Корм із добавками (1): із препаратом ферментів 1 (активність В-глюканази 100од./кг і активність ксиланази 1100од./кг).

3. Корм із добавками (2): із препаратом ферментів 2 (активність В-глюканази 200од./кг і активність ксиланази 2200од./кг).

Точні дози кормів одержують, розводячи препарат ферментів кукурудзяним крохмалем для створення попередньої суміші, яку потім додають до корму за необхідністю.

Збір зразків

Соки клубової кишки збирають протягом 48год. щотижня у відповідності зі стандартними процедурами в RPNA лабораторіях. Енергію зразків соку клубової кишки і тестованого корму аналізують за допомогою калориметричної бомби за Сандерсом (Sanders) для визначення засвоєної енергії. Аліквоти зразків бережуть для подальших аналізів за необхідністю.

Статистичний аналіз

Засвоюваність сирої енергії розраховують із результатів для соків здухвинної кишки, отриманих за допомогою калориметричної бомби, для кормів і споживання кормів. Аналіз відхилень починають по відношенню до розрахунків засвоюваності.

b. Результати й обговорення

Добавки ксиланази до корму свиней підвищують засвоюваність енергії, принаймні, на 6%. Це вказує на те, що фермент посилює руйнацію стінок клітин сирого матеріалу (зокрема, пшениці) і вивільнює додаткову енергію в тонкому кишечнику (табл. 23).

Таблиця 23

Вплив добавки препарату ферменту на енергетичну засвоюваність кормів на основі пшениці, якими годують свиней

Показник	Зразок корму на основі пшениці			
	без добавки	з добавкою (1)	з добавкою (2)	Величина p
Середнє, %	70,1	74,5	75,6	<0,001
Засвоюваність енергії	0,80	0,49	0,45	
Поліпшення, %		6,27	7,87	

Приклад 5. Вплив препарату ферментів, продукованих Penicillum funicolosum, на характеристики кормів із соломи, кукурудзяного силосу, сіна і трав'яного силосу у жуйних тварин.

HFT тест [Menke et al. Hohenheimer Futterwertesten. - 1979, 1988] являє собою in vitro інкубаційний тест, що дозволяє визначати розклад сирого матеріалу шляхом виміру об'єму газу, що виділяється під час ферментації цих кормів в забуференому соці рубця.

a. Матеріал і методи

200мг висушеного і здрібненого субстрату інкубують із 10мл соку рубця плюс 20мл буфера в шприцах, вміст яких обережно перемішують на роторі в інкубаторі з контрольованою температурою (39 °C). Об'єм газу, що виділився, реєструють через 24год. Для внесення поправок в результати проводять холостий (без субстрату) і стандартний контроль із сіном і стандартний контроль з концентратом (із відомою кількістю вироблюваного об'єму газу), і розраховують повний об'єм газу, вироблюваного за 24год. Енергетичну цінність (OMD) (засвоюваність органічної речовини) субстратів розраховують, використовуючи об'єм газу, що виділився за 24год., і використовуючи прогнозуючі рівняння, запропоновані Menke із співробітниками (1988).

Сік рубця збирають у 2 ялових корів, в рубець уводять канюлю і годують о 8 ранку і о 7 вечора кормом, що складається з 6кг сіна і 2кг концентрату (відношення 75/25). Сік рубця збирають безпосередньо перед ранковою годівлею. Сік рубця фільтрують, щоб уникнути проникнення харчових часток, і утримують в суворих анаеробних умовах.

Метою цього випробування є перевірка впливу добавки препарату ферменту на фураж за 15год. перед HFT інкубуванням.

Попередня обробка препаратом ферменту: розчин ферменту розпорошують на фураж, розкладений на підлозі, на солому, на кукурудзяний силос, на сіно і трав'яний силос. Розпилення здійснюють, використовуючи 1мл препарату ферментів на 2кг сухої речовини фуражу. Фураж із країв (біля 10см) видаляють, щоб підвищити однорідність зразка Після обробки фураж змішують вручну і лишають при кімнатній температурі на 15год. після обприскування. HFT інкубування здійснюють після 15год. контакту з препаратом ферментів для однієї серії і 6 повторів для кожної обробки.

b. Результати й обговорення

Повний об'єм газу, що виділився за 24год., показаний в табл. 24 для соломи, кукурудзяного силосу, сіна і трав'яного силосу.

Таблиця 24

Повний об'єм газу, виділений за 24год.

Сирий матеріал	Обробка	Повний об'єм газу	Статистичне значення
Солома	Контроль	25,0	<0,05
	Целюлаза	29,5	
Кукурудзяний силос	Контроль	53,7	<0,05
	Целюлаза	57,8	
Сіно	Контроль	39,5	<0,08
	Целюлаза	43,1	
Трав'яний силос	Контроль	43,7	<0,08
	Целюлаза	47,7	

Застосування целюлази для соломи в результаті попередньої обробки дає збільшення повного об'єму газу на

18% в порівнянні з контролем. Для кукурудзяного силосу таке збільшення складає 8%, для сіна 9,5% і для трав'яного силосу 9%.

OMD приведене в табл. 25 для різноманітних типів фуражу до і після попередньої обробки.

Таблиця 25

OMD аналіз . різноманітних типів фуражу до і після попередньої обробки

Сирий матеріал	Обробка	OMD	σ	Статистичне значення
Солома	Контроль	47,0	0,67	<0,05
	Целюлаза	51,0	2,37	
Кукурудзяний силос	Контроль	70,7	0,91	<0,05
	Целюлаза	74,2	2,19	
Сіно	Контроль	59,7	0,77	<0,08
	Целюлаза	62,9	3,27	
Трав'яний силос	Контроль	70,5	0,72	<0,08
	Целюлаза	74,0	3,46	

ОМ-засвоюваність відповідно підвищується для соломи, кукурудзяного силосу, сіна і трав'яного силосу в порівнянні з контролем на 8,5% для соломи, 5% для кукурудзяного силосу, 5,4% для сіна і 5% для трав'яного силосу.

Попередня обробка фуражу (соломи, кукурудзяного силосу, сіна і трав'яного силосу) препаратом ферментів протягом 15год. підвищує інтенсивність інкубування субстрату рубця і ОМ-засвоюваність субстрату.

Приклад 6: Вплив Препарату ферментів, продукованих Penicillиm funicolosum, на продуктивність несучок, яких годують пшеницею або ячменем

Цей експеримент здійснюють з метою визначити вплив додавання препарату ферментів на параметри продуктивності курок-несучок, яких годують пшеницею або ячменем.

а. Матеріал і методи

Схема експерименту: 4 обробки х 8 повторів х 5 клітин х 3 курки.

Обробки:

1. Контроль 1:60% пшениці;
2. Контроль 1 + препарат ферментів;
3. Контроль 2:60% ячменя;
4. Контроль 2 + препарат ферментів.

Тварини, утримання та експеримент

Експерименти проводять на 480 коричневих курках породи Hy-Line. Кожний повтор здійснюють для 5 курок із звичайними годівницями, тобто усього 32 повтори для 15 курок кожний.

Розподілені в двох ідентичних приміщеннях, ці повтори одержують програмоване освітлення і вентиляцію. Програма освітленості складає 14год. світла в день після прибуття курок віком 17 тижнів і підвищується кожні 2 тижні на 30хв. аж до максимального значення 17год. світла на день.

Вік курок на початку експерименту 22 тижні, що продовжується протягом 5 місяців періоду яйценосності.

Корми і годівля

Наявні два види експериментального корму на основі 60% пшениці (корм 1) і 60% ячменя (корм 2), і 10% муки соняшнику. Їхній склад приведений у табл. 26, а характеристики злаків - в табл. 27.

Таблиця 26

Порівняння експериментальних кормів для несучок

Інгредієнт	Вміст, %	
	пшеничний корм	ячмінний корм
Пшениця	60,171	-
Ячмінь	-	59,033
Тваринний та рослинний жири (30% лінолевої кислоти)	4,0	4,0
Екструдована соя з повним вмістом жиру	11,412	10,399
Соєва мука (48%)	3,443	5,705
Мука соняшника (29%)	10,0	10,0
DL-метіонін	0,091	0,101
L-лізин HCl	0,111	-
Карбонат кальцію	8,595	8,546
Дикальційфосфат	1,478	1,517
Сіль	0,30	0,30
Попередня суміш мінералів та вітамінів *)	0,40	0,40

Примітка: - *) 1кг корму містить: вітамін А – 8000од.; вітамін D3 – 1600од.; вітамін Е5 – 5мг; вітамін К3 – 2мг; вітамін В1 – 1,5мг; вітамін В2 – 4мг; вітамін В6 – 3мг; вітамін В12 – 11,8мг; фолієва кислота – 0,35мг; біотин – 150мкг; пантотенат кальцію – 10мг; нікотинова кислота – 20мг; Mn – 30мг; Zn – 50мг; I – 0,3мг; Fe – 50мг; Cu – 6мг; Se - 0,1мг; токсикоза – 125мг.

Таблиця 27		
Характеристика злаків для несучок		
Встановлена поживна цінність, %	Вміст, %	
	пшеничний корм*)	ячмінний корм **)
Сирий білок	16,00	16,41
Сирий жир	7,48	7,21
Лізин	0,75	0,76
Метіонін	0,35	0,35
Мітонін + цистеїн	0,67	0,69
Кальцій	3,70	3,70
Неорганічний фосфор	0,40	0,40
Хлорид натрію	0,16/0,27	0,15/0,29

Примітки:
*) Обмінна енергія пшеничного корму – 2800ккал/кг.
**) Обмінна енергія ячмінного корму – 2600ккал/кг.

Контроль

Хімічний аналіз:

Зразки корму

Контроль за якістю експериментальних кормів здійснюють, аналізуючи суху речовину, сирий білок, сирий жир і золу.

Активність ксиланази (Т-1, 1-2) і активність В-глюканази (Т-3 і Т-4) визначають у змішаних кормах.

Вимірювання

Витрати корму та ефективність корму реєструють кожні 4 тижні. Курок зважують на початку і наприкінці експерименту. Кількість знесених яєць, масу яєць і відсоток сухої речовини і жиру в яйцях записують щодня протягом 5 періодів по 4 тижні кожний. Смертність контролюють і реєструють щодня, включаючи її причину.

b. Результати і обговорення

Проведення експерименту

Отримані параметри продуктивності протягом експерименту представлені в табл. 28-30. В перші два періоди (тижні 22-30) у всьому експерименті статистично обробляється відсоток брудних яєць (Р >0,005). Птахи, яким дають корм без ферментів, несуть більше брудних яєць. Статистична значима різниця між обробками була виявлена для відсотка знесених яєць (Р >0,05) і для маси яєць (Р >0,005), починаючи із другого періоду до кінця експерименту. Курки, яких годували кормом на основі ячменя, демонструють великий відсоток знесених яєць, і вони несли більш важкі яйця, ніж курки, яких годували пшеницею. Препарат ферментів, очевидно, підвищує ці параметри, але не значно, із величиною 0,05 рівня можливості.

Таблиця 28

Параметри продуктивності несучок з 22 по 42 тижні (повний протокол експерименту)

Обробка	Яйценосність, %*)	Брудні яйця, %	Дефектні яйця, %	Маса яєць, г	Витрати корму, г	Ефект корму, l	Збільшення маси курок, г	Смертність, %
Т-1	75,6b	7,9a	0,8	62,29b	101,5b	2,158	219,8	1,7
Т-2	77,1b	6,6ab	1,1	62,66b	101,5b	2,100	222,6	0,8
Т-3	78,0ab	5,3b	1,0	63,76a	109,4a	2,203	231,8	2,5
Т-4	81,2a	6,6ab	1,0	64,22a	110,0a	2,211	227.7	5,0
	1,3	0,4	0,2	0,4	1,5	0,028	16,8	1,4
Ефект обробки, Р	0,0402	0,0039	0,7796	0,0036	0,0003	0,0659	0,9586	0,2645

Примітка: - *) Порівняння з генетично досконалими курками (дані представлені постачальником курок). Величини є середніми з 8 повторів для 15 курок. Всередині колонок значення з наступними різноманітними індексами значно відрізняються.

У всіх експериментальних періодах споживання корму птахами для Т-3 і Т-4 обробок (ячмінний корм) було вище, ніж споживання птахами, яким давали пшеницю, через енергетичні рівні обох кормів (ячмінний корм відповідає 2600ккал/кг енергії, тоді як пшеничний корм відповідає 2800ккал/кг). Враховуючи різні енергії кормів обох типів і споживання птахами корму, у весь період для всіх птахів щоденне споживання енергії було однаковим.

Ефективність корму (виражена як (г корму)/(г яєць) для експериментальних кормів протягом першого періоду була дуже висока через малу кількість яєць для кожної курки протягом цього відрізка часу. У перші два періоди ефективність корму з пшениці була вище ефективності корму з ячменя; але в третьому періоді, коли був зареєстрований більш високий відсоток знесених яєць, обидва типи кормів надали подібної ефективності. Починаючи з 34 тижня до кінця експерименту, ячмінні корми демонстрували більш високу кормову ефективність, ніж пшеничні корми. Ферменти виявили тенденцію поліпшити кормову ефективність (Р >0,05). У всі періоди В-глюканаза підвищувала кормову ефективність ячмінного корму (с=0,066).

В табл. 29 показано, що несучки, яких годували пшеницею з добавкою препарату ферментів, мали тенденцію

до демонстрації більш високих значень яйценосності (+1,5 абс. точок) в середньому більш важких яєць (+0,37г) і більш низький показник перетворення корму (-2,7%) у порівнянні з кормами без добавок.

Таблиця 29

Вплив препарату ферменту на параметри продуктивності несучок, яких годували пшеничним кормом

Період, тижні	Рівень яйценосності, %	Маса яєць, г	Показник перетворення корму, %	
			1	2
22-26	+1,0	-0,3	+0,067	-1,9
26-30	+1,1	+0,7	-0,098	-4,7
30-34	+1,4	+0,8	-0,039	-2,0
34-38	+2,1	+0,6	-0,039	-2,0
38-42	+2,3	-0,5	-0,042	-2,2
Всього, %*)	(+1,5)-(+2,0)	(+0,37)-(+0,6)	-0,058	-2,7

Примітка: - *) Для періоду 22-42 тижні.

Табл. 30 демонструє, що додавання препарату ферментів до ячмінного корму для несучок підвищує яйценосність (+4%) середню масу яєць (+0,7%) і показник перетворення корму (-5,7%) у порівнянні із контрольними ячмінними кормами.

Таблиця 30

Вплив препарату ферменту на параметри продуктивності несучок, яких годували ячмінним кормом

Період, тижні	Рівень яйценосності, %	Маса яєць, г	Показник перетворення корму, %	
			1	2
22-26	+3,7	+1,0	-0,381	-9,0
26-30	+3,0	+0,5	-0,137	-6,3
30-34	+1,9	+0,5	-0,015	-0,8
34-38	+3,3	+0,6	-0,067	-3,5
38-42	+0,9	+0,3	-0,082	-4,2
Всього, %*)	(-3,2)-(+4,0)	(+0,37)-(+0,6)	-0,092	-5,7

Примітка: - *) Для періоду 22-42 тижні.

Формула винаходу

1. Штам Penicillium funiculosum, депонований відповідно до Будапештської угоди у Міжнародному інституті Мікології під № IMI № 378536, що застосовується для одержання суміші ферментів для годівлі тварин.

2. Суміш ферментів, одержуваних з Penicillium funiculosum за п. 1.

3. Суміш ферментів за п. 2, що містить принаймні активність ксиланази та активність глюканази.

4. Суміш ферментів за п. 3, що містить принаймні активності ендо-1,3(4)-[illegible] -глюканази та ендо-1,4-[illegible]-ксиланази.

5. Суміш ферментів за будь-яким з пунктів 2-4, що застосовується для годівлі утримуваних на фермах тварин, таких як птиці, свині і жуйні.

6. Суміш ферментів за пунктом 5, що застосовується для підвищення засвоюваності злакових, таких як пшениця, ячмінь, жито, тритикале, овес, рис, насіння таких олійних як соя, соняшник, рапс; і побічних продуктів обробки зернових, таких як пшеничні висівки.

7. Суміш ферментів за будь-яким з пунктів 2-4, що застосовується для зниження екскреції фосфору.

8. Суміш ферментів за будь-яким з пунктів 2-4, що застосовується для підвищення засвоюваності фосфору.

9. Суміш ферментів за будь-яким з пунктів 2-4, що застосовується для підвищення засвоюваності амінокислот.

10. Суміш ферментів за будь-яким з пунктів 2-4, що застосовується для зменшення вмісту аміаку в повітрі батареї клітин.

11. Рідка композиція, що містить:

мікробні продукти як повний вміст органічних твердих речовин з Penicillium funiculosum IMI 378536	4 %-10 %
протимікробний агент	0,005 %-0,35 %
сорбіт	20 %-50 %
концентрований відфільтрований ферментаційний бульйон з Penicillium funiculosum IMI 378536	0,3 до 76 %
забуферена й доведена до pH 3 - 5 композиція.	

12. Рідка композиція, за п.11, яка додатково містить антифриз до 40 мас. % композиції.

13. Рідка композиція за п. 12, де антифриз складає 15-40 мас. % композиції.

14. Рідка композиція за пп. 11, 12, де згаданий протимікробний агент складає 0,01-0,25 мас. % композиції.

15. Рідка композиція за пп. 11, 12, де протигрибкові і/або протибактеріальні агенти вибирають із сорбінової кислоти та її солей, бензойної кислоти та її солей, метил-4-гідроксибензоату, н-пропіл-4-гідроксибензоату, фумарової кислоти, солей та естерів.

16. Рідка композиція за п. 15, де згадані солі являють собою хлорид натрію або хлорид калію.

17. Рідка композиція за п. 15 або 16, де антифризи вибирають з групи, що складається з 1,2-пропандіолу, етиленгліколю та гліцерину.

18. Рідка композиція за будь-яким з пунктів 11-17, що застосовується для годівлі утримуваних на фермах тварин, таких як птиці, свині і жуйні.

19. Рідка композиція, за п. 18, що застосовується для підвищення засвоюваності злакових, таких, як пшениця, ячмінь, жито, тритикале, овес, рис, насіння таких олійних як соя, соняшник, рапс; і побічних продуктів обробки зернових, таких як пшеничні висівки.

20. Рідка композиція за будь-яким з пунктів 11-17, що застосовується для зниження екскреції фосфору.

21. Рідка композиція за будь-яким з пунктів 11-17, що застосовується для підвищення засвоюваності фосфору.

22. Рідка композиція за будь-яким з пунктів 11-17, що застосовується для підвищення засвоюваності амінокислот.

23 Рідка композиція за будь-яким з пунктів 11-17, що застосовується для зменшення вмісту аміаку в повітрі батареї клітин.

24. Порошкова композиція, що має такий склад:

мікробні продукти як повний вміст твердих органічних речовин з ферментаційного бульйону Penicillium funiculosum IMI 378536	16 %-40 %
носій	59 %-83 %
інші висушені компоненти ферментаційного бульйону з ферментаційного бульйону Penicillium funiculosum IMI 378536	1 %.

25. Порошкова композиція за п. 24, де носії вибирають з групи, що складається зі пшеничної муки, крохмалю, гіпсу, мальтодекстрину, твердих продуктів обробки кукурудзи, побічних продуктів обробки олійних, таких як соя, соняшник, насіння рапсу; і побічних продуктів обробки зернових, таких як пшеничні висівки.

26. Порошкова композиція за будь-яким з пунктів 24, 25, що застосовується для годівлі утримуваних на фермах тварин, таких як птиці, свині і жуйні.

27. Порошкова композиція за п. 26, що застосовується для підвищення засвоюваності злакових, таких як пшениця, ячмінь, жито, тритикале, овес, рис, насіння таких олійних як соя, соняшник, рапс; і побічних продуктів обробки зернових, таких як пшеничні висівки.

28. Порошкова композиція за будь-яким з пунктів 24, 25, що застосовується для зниження екскреції фосфору.

29. Порошкова композиція за будь-яким з пунктів 24, 25, що застосовується для підвищення засвоюваності фосфору.

30. Порошкова композиція за будь-яким з пунктів 24, 25, що застосовується для підвищення засвоюваності амінокислот.

31. Порошкова композиція за будь-яким з пунктів 24, 25, що застосовується для зменшення вмісту аміаку в повітрі батареї клітин.

32. Спосіб одержання суміші ферментів для годівлі тварин, що включає наступні етапи:

(a) ферментацію Penicillium funiculosum за п. 1,

(b) видалення твердих речовин шляхом поділу на тверду та рідку фази,

(c) збирання рідкої фази, та

(d) концентрацію рідкої фази, що містить суміш ферментів.

33. Поліпептид, що має активність ксиланази C, послідовність якого представлена як послідовність з ідент. № 1 і на Фіг. 1, одержаний зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536.

34. Поліпептид або його варіант, що має активність ксиланази C та кодується нуклеїновою кислотою, виділеною зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536, що включає послідовність нуклеїнових кислот, представлену як послідовність з ідент. № 1.

35. Поліпептид, що має активність ксиланази BI, послідовність якого представлена як послідовність з ідент. № 4 і на Фіг. 2, одержаний зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536.

36. Поліпептид або його варіант, що має активність ксиланази BI та кодується нуклеїновою кислотою, виділеною зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536, що включає послідовність нуклеїнових кислот, представлену як послідовність з ідент. № 4.

37. Поліпептид, що має активність ферулоїлестерази A, послідовність якого представлена як послідовність з ідент. № 5 і на Фіг. 3, одержаний зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536.

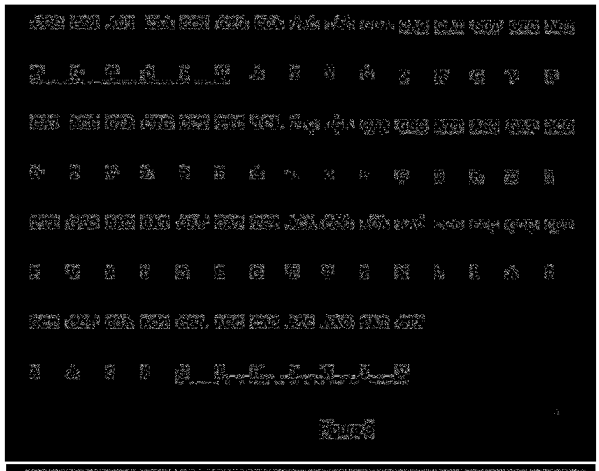
38. Поліпептид або його варіант, що має активність ферулоїлестерази A та кодується нуклеїновою кислотою, виділеною зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536, що включає послідовність нуклеїнових кислот, представлену як послідовність з ідент. № 5.

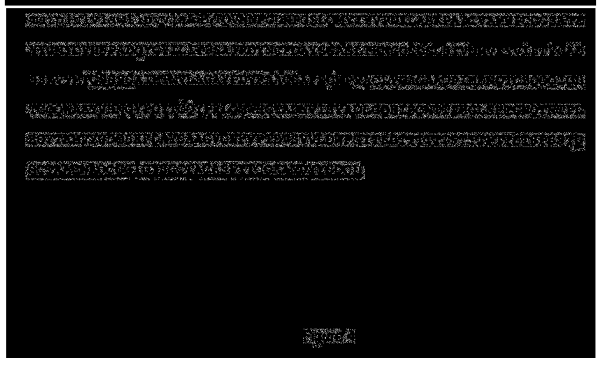
39. Поліпептид, що має активність ферулоїлестерази B, послідовність якого представлена як послідовність з ідент. № 6 та на Фіг. 4, одержаний зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536.

40. Поліпептид, що має активність ксиланази A, внутрішня амінокислотна послідовність якого представлена як AEAINYNQDY, одержаний зі штаму Penicillium funiculosum IMI № 378536.

UA 77381 C2

UA 77381 C2





Офіційний бюлетень "Промислоава власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 12, 15.12.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 77381 C2

UA 77381 C2