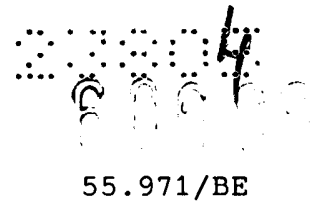


960/92

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



## K I V O N A T

Szilázstakarmány enzimes kezelése

GIST-BROCADES N. V., DELFT, HOLLANDIA

A bejelentés napja: 1991. 07. 24.

Elsőbbsége: 1990. 07. 24. (90202020.5) EURÓPA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL91/OO136

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/O1389

A találmány a szilázstakarmányok enzimes kezelésére vonatkozik. A találmány szerint a silózandó takarmányt megfelelő mennyiségű endo-xilanázzal egészítik ki annak érdekében, hogy a szilázs optimális eltarthatóságát és tápértékének növelését biztosítsák. A találmány olyan szilázs készítményeket ismertet, amelyek tejsavbaktériumból álló inokulumot is tartalmaznak. A felhasznált endo-xilanázt fonalas gombából állítják elő.

*Feladván*

960/92

2000

9 0 0 0 0

S.B.G. & K.  
Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

55.971/BE

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

A

N205

A 23K3/03

C12N9/24

A 23K1/165

Szilázstakarmány enzimes kezelése

GIST-BROCADES N. V., DELFT, HOLLANDIA

Feltaláló: HARDER Abraham, BERKEL en RODENRIJS, HOLLANDIA

A bejelentés napja: 1991. 07. 24.

Elsőbbsége: 1990. 07. 24. (90202020.5) EURÓPA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL91/00136

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/01389

A találmány a mezőgazdaság területére vonatkozik.  
Részletesebben kifejtve, a találmány a szilázstakarmány  
enzimes kezelésének a javítására vonatkozik.

A szilázs-technológiában végrehajtott fejlesztések következtében, a természetes és mesterséges szárítás mellett, a silózás vált a legszélesebben alkalmazott technológiává a takarmány tartósítására. Úgy becsülik, hogy Nyugat-Európában a télire tartósított takarmány 60 %-át (köribelül 77 millió tonna szárazanyag) silózzák. Az Egyesült Államokban körülbelül évi 80 millió tonnát (szárazanyag) silóznak. A silózást széles körben alkalmazzák Kelet-Európában és Kanadában is. Azonban az erjedés (főként vajsavas erjedés) következtében a keletkező csurgaléklé és a tápanyag veszteségek, valamint az aerob bomlás egyre növekvő problémává vált azáltal, hogy megnőtt az igény a nagyobb hatékonyságú állattenyésztés iránt. Ezek a problémák gyakran olyan faktoroktól függenek, mint a termés típusa, az éghajlati viszonyok és a rendelkezésre álló technológia. Néhány ország tejgazdálkodásában legújabbán bevezetett termelési korlátozások és a környezetvédelmi törvények, amelyek közvetve korlátozzák az állattenyésztéshez használt tápanyag típusát és mennyiségét, aláhúzzák annak szükségességét, hogy nagyon jó minőségű szilázstakarmánnyal kell etetni [S. F. Spoelstra, Forage Conservation Towards 2000; Proceedings of the EGF Conference, Braunschweig, Németország (1991)]<sup>7</sup>.

A fűfélék (ilyenek például a perjék stb.), a gabonafélék (például a kukorica, cirok, búza stb.) és a pillangósok (például a lucerna, lóhere stb.) azok a termények, amelyeket elsődlegesen silóznak takarmány céljára.

A leveles répafejet és a cukorrépa pépet szintén felhasználják, de viszonylag kis mennyiségben.

A kukorica jól silózódik, de érzékeny az aerob bomlásra. A fűféléket — főként az angol perjét (perennial ryegrass) — gyakran erősen trágyázzák, és ennek eredményeként kevés vízoldható szénhidrátot tartalmaznak a pufferkapacitás biztosításához, s így silózás után érzékennyé válnak a vajsavas erjedésre. A vajsavas erjedés szárazanyag veszteséget okoz a szilázstakarmányban, tehát csökkenti tápértékét, s ennek következtében az állattartás hatékonyságát.

A nem kívánt vajsavas erjedés elkerülése érdekében a fűvet rendszerint fonnyasztják a réten, amikor is kg-onként átlag 500 g szárazanyag keletkezik. Egy más módszer szerint 350 g szárazanyag/kg tartalom alatt adalékanyagokat - például enzimeket - alkalmaznak.

Folyamatos kísérletek során erőfeszítések történtek annak tanulmányozására, hogy vajon a szilázs eltartóhatóságát javítja-e és a szilázs felvételét és emészthetőségét fokozza-e a sejtfalat bontó enzimek, azaz a cellulázok és hemicellulázok adagolása.

A cellulázok és a hemicellulázok hatására vízoldható szénhidrátok szabadulnak fel a növényi sejtfal struktúrális poliszacharidjaiból, s e szénhidrátok a tejsavtermelésben mint szubsztrátumok vesznek részt. A tejsavképződés a szilázstakarmányban jelenlévő tejsavbaktériumok fermentatív tevékenységének a következménye. Valószínűleg ezek az enzimek felelősek a növényi sejtfalak biológiai felhasításáért, melynek következtében további víz-

oldható szénhidrátok és más anyagok szabadulnak fel, amelyeket a tejsav baktériumok felhasználnak. A szilázs tárolása folyamán a növényi sejtfalak előemésztésének ezenkívül az lesz a következménye, hogy a szilázs a bendőben gyorsabban lebomlik, s ez fokozza emészthetőségét; továbbá, hogy növeli a felszabadított szénhidrátok mennyiségét, tehát az így kezelt szilázstakarmányt fogyasztó állat számára nagyobb tápértéket biztosít.

A szilázsban jelenlévő tejsav baktériumok által termelt tejsav (és ecetsav) szintén felelős a szilázs pH-jának csökkenéséért. Az alacsony pH — a pH általában körülbelül 4,5-ig csökken, de körülbelül 4 is lehet — kedvezőtlen környezetet teremt az élesztők és számos más nem kívánt mikroba — ilyenek a vajsav termelő mikroorganizmusok — növekedése számára. Ez a környezet tartósítja a szilázst, és fenntartja tápanyagtartalmát.

A tejsav baktériumok ezenkívül mint probiotikumok, jótékonyan növelik a szilázst fogyasztó állat bélflóráját.

A legtöbb — hacsak nem az összes — olyan vizsgált enzim-készítmény, amely szilázsban való felhasználás céljára készül, gomba eredetű, meglehetősen nyers fermentációs termék. Ezek az enzim készítmények több különböző enzim aktivitást tartalmaznak.

Például a DD-278359 számú németországi szabadalmi bejelentés (nyilvánosságra hozva 1990. május 2-án) tárgya egy celluláz készítmény, amelyet *Penicillium verruculosum* mutáns törzsből állítottak elő, cellulóz és hemicellulóz részleges vagy teljes hidrolízisére olyan ipari eljárások-

ban való felhasználás céljára, mint — többek között — a szilázstakarmány előállítás. E celluláz készítményről azt állítják, hogy magas cellulolítikus aktivitású, mely béta-glükózidáz, xilanáz és amiláz aktivitással párosul. A WO 89/01970 közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentés (nyilvánosságra hozva 1989. március 9-én) szilázstakarmány számára előállított probiotikus inokulumot ír le, amely a szilázstakarmányban lévő poliszacharidok és oligoszacharidok lebontására képes enzimet kódoló exogén DNS-sel transzformált tejsav baktériumokat tartalmaz, és így a baktérium magának állítja elő a vízoldható szénhidrát forrást.

A feltalálók — a találmány szerint — megállapították, hogy a takarmány silózáshoz használt enzim készítményekben lévő enzim aktivitások közül főként az endo-xilanáz felelős a vízoldható szénhidrátok felszabadításáért, és ez a tejsav baktériumok erjesztő tevékenységén keresztül a szilázstakarmány tartósítását és tápértékének minőségi javulását eredményezi. Ezenkívül megállapították, hogy ha a silózanódó takarmányt megfelelő mennyiségű endoxilanázzal egészítik ki más enzim aktivitások jelenlétében vagy távollétében, úgy ez az ilyen módon kezelt szilázstakarmánynak optimális eltarthatóságot és tápértékének optimális minőséget biztosít. Megfigyelték, hogy az állatok nagyobb mennyiséget fogyasztanak az így tartósított szilázsból, mint a megromlott szilázsból. Mindezen faktorok az állattenyésztés hatékonyságát fokozzák.

A találmány tehát olyan szilázs készítményt ismertet, amelyet annyi endo-xilanáz aktivitással egészítünk ki, amennyi hatékonyan szabadítja fel a vízoldható szénhidrátokat a

besilózott növényi sejt anyagból (takarmányból), és így fokozza a tejsavbaktériumok tejsav és ecetsav termelését, melynek következtében javul a szilázstakarmány eltarthatósága és tápértékének minősége. Az endo-xilanázt előnyösen lényegében más enzimaktivitástól mentes formában adagoljuk.

Minthogy a silózandó takarmány nem tartalmaz mindig elégséges mennyiséget tejsav baktériumokból a célravezető silózáshoz, a találmányban olyan szilázs összetételeket ismertetünk, amelyek még tejsav baktérium inokulumot is tartalmaznak. Ezt a kiegészítést olyan mennyiségben alkalmazzuk, amely elégséges ahhoz, hogy a szilázstakarmány tartósítását segítse, és mint probiotikum közreműködjen az ilyen módon kezelt szilázs készítményt fogyasztó állat bélflórájának javításában.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a szilázstakarmány tartósítására. Az eljárás abból áll, hogy a szilázst olyan mennyiségben egészítjük ki endo-xilanáz aktivitással, amennyi hatékonyan növeli meg a szilázsban jelenlévő vízoldható szénhidrátok mennyiségét. A keletkező szénhidrátokat a tejsav baktériumok tejsav és ecetsav termelésükhöz használják fel.

Vonatkozik a találmány a szilázs tápértékének javítását szolgáló eljárásra, amelyben a szilázst annyi endo-xilanáz aktivitással egészítjük ki, amennyi hatékonyan szabadítja fel a besilózott növényi sejt anyagból a vízoldható szénhidrátokat a szilázst elfogyasztó állat számára. A szilázsban jelenlévő endo-xilanáz magának az állatnak is fontos enzim kiegészítést jelent.

A találmány tárgyát képezi egy további eljárás is, amellyel állatokban a szilázstakarmány in vivo (szárazanyag) emészthetőségét javítjuk. Eszerint az állat étrendje legalább részben szilázstakarmányból áll, amelyet annyi endo-xilanáz aktivitással egészítettünk ki, hogy az legalább részben elbontsa — tehát előeméssze — a növényi sejtfalat.

Az ábra rövid ismertetése

1. ábra:

*Aspergillus niger* DS16813 (CBS 323.90) törzs tenyészlé szűrletének HPLC elúciós képe. Ezt a törzset később újból osztályozták, tekintettel arra, hogy valószínűbb, hogy az *Aspergillus tubigenensis* fajhoz tartozik.

A jelen találmány szerint tehát olyan mennyiségű endo-xilanáz aktivitással egészítjük ki a silózandó takarmányt, hogy az hatékony legyen a szilázs előállításában, azaz a szilázsban jelentősen növelje a vízoldható szénhidrátok mennyiségét a tejsav baktériumok számára vagy táplálékul szolgáljon a szilázst fogyasztó állat számára; hogy javítsa a minőséget, például úgy, hogy a (probiotikus) tejsav baktériumok tejsav és ecetsav termelő fermentatív tevékenysége (a tejsav nagyobb mennyiségben termelődik az ecetsavhoz képest) növekedjék, melynek következtében csökken a pH. Az alacsony pH arra szolgál, hogy a szilázs készítményt tartósítsa, és tápértékét biztosítsa. Mindezen faktorok hozzájárulnak az állattenyésztés hatékonyságának a javításához. E találmány bejelentéséig nem volt ismert, hogy speciálisan az endo-xilanázok azok, amelyeknek igen jelentős a szerepük a javított szilázstakarmányok termelésében. Az sem volt ismeretes,

hogy lényegében más enzim aktivitásoktól (főként más sejtfal bontó enzimaktivitásoktól) mentes endo-xilanáz adagolása a silózandó takarmányhoz olyan szilázstakarmányt eredményez, amely nemcsak jobban tartósított, hanem jobb tápértékkel is rendelkezik.

A jelen találmány szerinti szilázs készítmények előnyösen több mint 50.000 egység endo-xilanáz aktivitást tartalmaznak 1 kg (betárolt tömeg) takarmányra számítva. Az endo-xilanáz optimális pH tartománya 3,5-6,0 közé esik. Ez biztosítja, hogy a takarmány silózásánál uralkodó savanyú pH viszonyok mellett maximális enzim hatékonyságot érjünk el. Mint fent megjegyeztük, előnyös, ha az endo-xilanázt olyan formában adagoljuk, amely általában lényegében más enzim aktivitásokat és főként más sejtfal bontó enzim aktivitásokat nem tartalmaz.

A silózandó takarmány kiegészítése más enzim aktivitásokat lényegében nem tartalmazó endo-xilanáz aktivitással, mint költségre ható tényező, kereskedelmi szempontból is előnyös az olyan enzim keverékekkel szemben, amelyekben a másodlagos enzim aktivitásokat gyakran kell kiegészíteni a kívánt hatás elérése érdekében. A találmány szövegében a "más enzimektől lényegében mentes" kifejezés azt jelenti, hogy az enzim készítményben lévő össz-protein nagy része (azaz a tömeg legalább 50 %-a, előnyösen a tömeg 80 %-a) endo-xilanáz.

Endo-xilanáz aktivitás nagymennyiségben való előállítását teszi lehetővé a rekombináns DNS technológia használata, lásd például a 90202020.5 számú európai sza-

badalmi bejelentést (benyújtva 1990. július 24-én), mely ebben a leírásban referenciaként szerepel. Egy másik lehetőség szerint, az endo-xilanáz termelést úgy is növelhetjük, hogy az endo-xilanáz termelő mikroorganizmus fermentációs feltételeit, például xilánt tartalmazó indukciós közeg használatával szabályozzuk.

A találmány szerinti felhasználáshoz az endo-xilanázokat előnyösen fonalas gombákból állítjuk elő, még előnyösebben az *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium* és *Trichoderma* nemzetségekből kiválasztott fonalas gombából és legelőnyösebben az *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tubigenis*, *Disporotrichum dimorphosporum* és *Trichoderma reesei* fajokból kiválasztott fonalas gombából.

A jelen találmány szerint használatos endo-xilanáz azonosítására szolgáló vizsgáló módszerek nem lényegesek a találmány szempontjából. Ilyen például a spot teszt. Eszerint a módszer szerint az endo-xilanáz termelésre indukált (például tönkönybúza xilánnal) mikroorganizmus tenyésztésének szűrletét endo-xilanáz jelenlétére vizsgálhatjuk. A kioldott frakciókból egy-egy cseppet citrát-foszfát puffert (lásd alább az 1. példát) és tönkönybúza xilánt tartalmazó agar filmre cseppentünk. A filmet ezután inkubáljuk. Ha van endo-xilanáz aktivitás, az agar filmen lévő egyes cseppek helye feltisztul.

Az endo-xilanáz aktivitást úgy is kimutathatjuk, hogy egy xilánt tartalmazó oldatot összehozunk egy olyan enzim oldattal, amely gyaníthatóan endo-xilanáz aktivitást tar-

talmaz, majd spektrofotometriásan mérjük a redukáló cukrokat a T. D. Leathers és munkatársai által leírt [Biotechnol. Bioeng. Symp., 14, 225 (1984)] módszerrel.

Az endo-xilanáz aktivitás egységét a következőképpen határoztuk meg: egy egység aktivitás alatt a xilóz ekvivalensek azon mennyisége ( $\mu$ mol) értendő, melyet 1 mg protein 1 perc alatt szabadít fel 39 °C-on pH = 3,5 mellett. A protein meghatározást M. M. Bradford [Anal. Biochem., 72, 248 (1976)] módszerével végeztük. Protein standardként bovin immun-gamma-globulint (BIGG) használtunk.

Mihelyt azonosítunk egy endo-xilanáz termelő mikroorganizmust, fermentációját olyan körülmények mellett végezzük, melyek elősegítik az endo-xilanáz termelését, majd a kívánt enzim aktivitást a termelő mikroorganizmus tenyésztéséből izolálhatjuk, és kívánt esetben a találmány szempontjából nem lényeges, hagyományos módon tisztíthatjuk. Például affinitás- és/vagy ioncserélő-kromatográfiás technikák előnyösen használhatók az endo-xilanáz tenyésztéséből való preparatív tisztítására.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formája célul tűzi ki a kereskedelmi enzim készítmények kiegészítését endo-xilanáz aktivitással. Előnyös, ha annyi endo-xilanáz aktivitást adagolunk, mellyel a végső keverékben a teljes endo-xilanáz aktivitást több mint 50.000 egység/kg betárolt takarmány tömegre állítjuk be.

A találmány egy további kivitelezése szerint olyan szilázs készítményeket állítunk elő, amelyek még tejsav baktérium inokulumot is tartalmaznak kiegészítés gyanánt,

a szilázs tartósításának elősegítésére. A tejsav baktériumokat előnyösen a *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* és *Leuconostoc* nemzetségekből álló csoportból választjuk ki. A találmány szerint legelőnyösebb tejsav baktériumokat a következő csoportból választjuk ki: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* és *Lactobacillus lactis*.

A találmány szeritn a szilázstakarmány endo-xilanázzal való kiegészítése a gyakorlott szakemberek által ismert minden silózható növényi anyagnál - ilyenek a fűvek, gabonafélék és pillangósok - alkalmazható. A takarmánynak mindamellett rendes körülmények között 1 kg (friss, betárolt tömeg) takarmányra számítva 350 g alatt lesz a szárazanyag tartalma, s így az enzim szabadon hozzáfér a növényi sejt anyaghoz.

Az alábbi példák közreadásával teljes ismertetést és leírást adunk a szakterületen jártas szakemberek számára arról, hogy a találmányt hogyan alkalmazzák és használják. A feltalálók e példákkal nem óhajtják korlátozni találmányuk oltalmi körét. Ami a megadott számokat illeti (például: mennyiség, hőmérséklet, pH stb.) törekedtünk a pontosságra, de bizonyos kísérleti hibákkal és eltérésekkel számolni kell. Ha másként nem jeleztük, a hőmérsékletet Celsius fokban adtuk meg. A nyomás atmoszferikus vagy ahhoz közeli.

#### 1. példa:

##### *Aspergillus tubigenensis* endo-xilanáz tisztítása

*Aspergillus niger* DS16813 törzset / CBS 323.90; le-  
tétbe helyezve a Centraal Bureau voor Schimmelcultures

intézményben (Baarn, Hollandia) 1990. július 20-án - a törzset később újra osztályozták, tekintve, hogy inkább az *A. tubigen-sis* fajhoz tartozik; Kusters-van Someren et al., Curr. Genet., 19, 21 (1991)\_7 tenyésztünk olyan táptalajban, mely literenként 30 g tönkönybúza xilánt (SIGMA), 7,5 g ammónium-nitrátot, 0,5 g magnézium-szulfátot, 15 g kálium-dihidrogén-foszfátot és 0,5 g élesztő kivonatot (pH = 6,0) tartalmaz. A tenyészet szűrlését körülbelül 35 ml-re koncentráljuk, s e mennyiséget ezután Diaflo PM 10 szűrőn, 50 ml-es Amicon készülékben ultraszűrjük.

A felülúszót ezután 10 ml-re koncentráljuk, és a visszamaradt anyagot kétszer mossuk 25 ml 25 mM trisz.HCl pufferrel (pH = 7,0). Mosás után a kapott mennyiséget 25 ml-re egészítjük ki.

Ezt az anyagot 1 ml-es mennyiségekben Syn Chropak AX 300 oszlopra (10 x 250 mm) visszük fel, ahonnan a következő HPLC előírás szerint eluáljuk:

elúciós sebesség: 2 ml/perc

elúciós puffer A: 25 ml trisz.HCl, pH = 7,0,

elúciós puffer B: 25 ml trisz.HCl, pH = 7,0 + 1 M

nátrium-klorid,

| elúciós grádiens: idő (perc) | %A | %B  |
|------------------------------|----|-----|
| 0                            | 99 | 1   |
| 12                           | 97 | 3   |
| 30                           | 80 | 20  |
| 50                           | 50 | 50  |
| 70                           | 0  | 100 |
| 90                           | 0  | 100 |
| 95                           | 99 | 1   |

A frakciókat 1 ml-enként szedjük. A leoldott proteint folyamatosan, a 280 nm-en leolvasott UV abszorpcióval mérjük. Az elúciós profilt az 1. ábrán mutatjuk be.

A frakciókat endo-xilanáz jelenlétére spot teszt segítségével vizsgáljuk. A spot tesztet a következőképpen végezzük: 12 ml 0,5 % tönkönybúza xilánt (Sigma) tartalmazó citrát-foszfát puffert (úgy készítjük, hogy 900 ml 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát-oldatot és 125 ml 0,5 M citromsav oldatot elegyítünk, majd az oldat pH-ját 5,6-ra állítjuk be vagy 0,5 M citromsav oldattal, vagy 0,1 M dinátrium-hidrogén-foszfát-oldattal adunk 180 mg agarhoz (Difco), s a keveréket 100 °C-ra melegítjük, hogy az agar oldódjék. Az agaros keveréket 60 °C-ra hűtjük, és ezután egyenletesen agaróz gél filmre önjtük. Az eluált frakciókból egy-egy cseppet cseppentünk a filmre, és 30 percig 30 °C-on inkubáljuk. Ha endo-xilanáz aktivitás van jelen, akkor az agar filmen a cseppek helye tiszta lesz.

A leszedett frakciókban az össz xilanáz aktivitás mennyiségi meghatározását úgy végezzük, hogy mérjük egy előre meghatározott időtartam alatt a termelt redukáló cukrok mennyiségét a Leathers és munkatársai (1984) által leírt mikro-assay segítségével, szubsztrátumként 50 mM nátrium-acetátban (pH = 5,0) tönkönybúza xilán használatával. Az aktivitás egységét szintén Leathers (lásd fent) határozta meg.

A kioldott frakciókban az endo-xilanáz aktivitást Poutanen és Puls (1988) módszerével határoztuk meg, szubsztrátumként p-nitro-fenil-β-D-xilopiranozid (0,3 mM; Sigma) használatával, pH = 5,0 és 30 °C mellett.

A spot teszttel kimutattuk, hogy a B, F és K csúcsoknak (lásd az 1. ábrát) megfelelő eluált frakciók endo-xilanáz aktivitást tartalmaznak. Az össz xilanáz vizsgálat a B, F, H és K csúcsoknak megfelelő kioldott frakciókban mutatott ki aktivitást. A B és H csúcsoknak megfelelő frakciókban exo-xilanáz aktivitást mutatott ki a vizsgálat.

Az F csúcs (XYL2 protein) és a K csúcs (XYL A protein) kioldott frakcióit tovább tisztítottuk ismételt ioncserélő kromatográfiával.

## 2. példa:

Angol perjét (perennial English rye-grass) kaszálunk, 24 óra hosszat szárítjuk, míg egy körülbelül 25 %-os szárazanyag tartalmat el nem érünk. 1-2 cm-es szálakra vágjuk, és 1 literes laboratóriumi silókban besilózzuk, majd analízis előtt 3 hónapig tároljuk a környezet hőmérsékletén.

A silózott fűhöz Cellulase ABG-7 enzim készítményt adunk 0,2 g protein/kg friss fű-tömeg koncentrációban / $\overline$ egyenértékű 3200 egység endo-xilanáz aktivitás/kg takarmánnyal; a protein tartalmat M. M. Bradford (lásd fent) módszerével határoztuk meg $\overline$ . A Cellulase ABG-7 kereskedelmi enzim készítmény; kapható MAXAZYM CL-2000 néven (IBIS N.V., Rijswijk, Hollandia). Az enzimet a Trichoderma reesei termeli. E termék enzim aktivitásait az 1. táblázatban foglaljuk össze.

## 1. táblázat

Cellulase ABG-7 készítmény enzimatis aktivitásai

| Aktivitás         | Mért termék           | Specifikus aktivitás<br>μmól/perc/mg protein |
|-------------------|-----------------------|----------------------------------------------|
| CMC-áz            | glükóz ekvivalens     | 0,79                                         |
| Aviceláz          | glükóz ekvivalensek   | 0,11                                         |
| Endo-xilanáz      | xilóz ekvivalensek    | 16,0                                         |
| Exo-xilanáz       | p-nitro-fenol         | 0,48                                         |
| Exo-arabináz      | p-nitro-fenol         | 0,51                                         |
| Acetil-észteráz   | p-nitro-fenol         | 0,16                                         |
| Poli-galakturonáz | galaktóz ekvivalensek | 3,56                                         |
| Glukuronidáz      | p-nitro-fenol         | 0,003                                        |
| α-amiláz          | glükóz                | 0,25                                         |

A szilázs kísérlet eredményeit a 2. táblázatban mutatjuk be.

## 2. táblázat

A fű, a kontroll szilázs, valamint — Cellulase ABG-7 készítménnyel való kezelés után — az enzimmel kezelt szilázs átlagos (N=3) összetétele

|                                      |                     |      | SZILÁZS |          |                 |
|--------------------------------------|---------------------|------|---------|----------|-----------------|
|                                      |                     |      | Fű      | Kontroll | Cellulase ABG-7 |
| Szárazanyag (SZA)                    | (g/kg)              | 273  | 269     | 259      | *               |
| Hamu                                 | (g/kg SZA)          | 124  | 124     | 136      | *               |
| Tejsav                               | (g/kg SZA)          | -    | 45,5    | 59,4     | *               |
| Etanol                               | (g/kg SZA)          | -    | 7,33    | 19,1     | *               |
| Ecetsav                              | (g/kg SZA)          | -    | 46,9    | 82,8     | *               |
| Nyers rost                           | (g/kg SZA)          | 258  | 262     | 194      | *               |
| Neutrális<br>detergens<br>rost (DNF) | (g/kg SZA)          | 523  | 446     | 351      | *               |
| Savanyú<br>detergens<br>rost (ADF)   | (g/kg SZA)          | 279  | 281     | 204      | *               |
| Savanyú<br>detergens<br>lignin (ADL) | (g/kg SZA)          | 17,5 | 15,9    | 18,5     | *               |
| Tömegveszteség                       | (g/kg SZA)          | -    | 49,9    | 76,3     | *               |
| NH <sub>3</sub> -N/Össz N            | (Össz-N-<br>tömeg%) | -    | 5,42    | 4,72     |                 |

\* Statisztikusan eltér a kontrolltól.  $P < 0,05$  (Student T-teszt)

NDF = Neutral Detergent Fiber

ADF = Acid Detergent Fiber

ADL = Acid Detergent Lignin

A Cellulase ABG-7 a sejtfal alkotórészének nagy részét fermentálható (erjeszthető) szénhidrátokká hidrolizálja. Ez a körülmény a szilázs minőségének javulását eredményezi, melyet a vízoldható szénhidrátok felszabadulása jellemez. Ennek bizonyítéka a megnövekedett tejsav koncentráció és az alacsonyabb nyersrost tartalom, az alacsonyabb NDF tartalom, az alacsonyabb ADF tartalom, valamint az alacsonyabb pH és ammónia érték a kontrollal való összehasonlításban.

### 3. példa:

Angol perjét készítünk elő a 2. példában leírtak szerint, majd 1 literes laboratóriumi silókban besilózzuk, és analízás előtt 3 hónapig tároljuk a környezet hőmérsékletén.

A Cellulase ABG-7 enzimet a következő koncentrációkban adagoljuk: 0,05 g protein (80 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg; 0,025 g protein (400 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg; 0,050 g protein (800 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg; 0,075 g protein (1200 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg [a protein tartalmakat M. M. Bradford (lásd fent) módszerével határoztuk meg].

Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

### 3. táblázat

A fű és a szilázsok átlagos (N=3) összetétele

|                                           | Fű         | KONTROLL<br>SZILÁZS | SZILÁZS                             |        |        |       |   |       |   |
|-------------------------------------------|------------|---------------------|-------------------------------------|--------|--------|-------|---|-------|---|
|                                           |            |                     | CELLULÁZ ABG-7<br>(g protein/kg fű) |        |        |       |   |       |   |
|                                           |            |                     | 0,005                               | 0,025  | 0,050  | 0,075 |   |       |   |
| Szárazanyag                               | (g/kg)     | 233                 | 223                                 | 223    | 221    | 219   | * | 219   | * |
| Hamu                                      | (g/kg SZA) | 111                 |                                     |        |        |       |   |       |   |
| Tejsav                                    | (g/kg SZA) | -                   | 117                                 | 102    | 116    | 126   |   | 120   |   |
| Etanol                                    | (g/kg SZA) | -                   | 5,73                                | 4,22*  | 4,44*  | 4,97* |   | 4,95* |   |
| Ecetsav                                   | (g/kg SZA) | -                   | 33,7                                | 26,5 * | 20,0 * | 32,6  |   | 34,5  |   |
| Nyers rost                                | (g/kg SZA) | 256                 | 249                                 | 252    | 247    | 242   |   | 233   | * |
| NDF                                       | (g/kg SZA) | 505                 | 428                                 | 430    | 427    | 413   | * | 403   | * |
| ADF                                       | (g/kg SZA) | 275                 | 268                                 | 266    | 261    | 257   | * | 254   | * |
| ADL                                       | (g/kg SZA) | 19,7                | 20,8                                | 20,4   | 21,8   | 20,8  |   | 20,7  |   |
| Tömegveszteség                            | (g/kg SZA) | -                   | 39,9                                | 26,9 * | 25,8 * | 34,7  |   | 36,8  |   |
| NH <sub>3</sub> -N/össz N (össz N tömeg%) |            | -                   | 16                                  | 14 *   | 11     | 14 *  |   | 15    |   |
| pH                                        |            | -                   | 4,25                                | 4,09*  | 3,93*  | 4,10* |   | 4,11* |   |

\* Statisztikusan eltér a kontrolltól.  $P < 0,05$  (Student T-teszt)

0000

4. példa:

Angol perjét készítünk elő a 2. példában leírtak szerint, majd 1 literes laboratóriumi silókban besilózzuk, és analízás előtt 3 hónapig tároljuk a környezet hőmérsékletén.

Ebben a kísérletben egy *Aspergillus tubigenis* eredetű tisztított endo-xilanázt [specifikus aktivitás: 5000 egység endo-xilanáz aktivitás per kg takarmány (Bradford féle proteín meghatározási módszer; lásd fent; lásd az 1. példát)] kombinálunk Celluláz ABG-7 készítménnyel, hogy növeljük a készítmény endo-xilanáz aktivitását, és ezt adjuk a fűhöz. A fűhöz adagolt kombinált enzim termékben az endo-xilanáz koncentrációja 0,050 g protein (250.000 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg és az adagolt Cellulase ABG-7 koncentrációja 0,200 g protein (3200 egység endo-xilanáz aktivitás) per kg friss fű-tömeg volt [a protein tartalmakat M. M. Bradford módszerét használva határoztuk meg (lásd fent)].

Az eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

## 4. táblázat

A fű és a szilázsok átlagos összetétele (N=3)

|                           |                 | SZILÁZS |          |           |              |       |   |
|---------------------------|-----------------|---------|----------|-----------|--------------|-------|---|
|                           |                 | FŰ      | KONTROLL | CELLULASE | CELLULASE    |       |   |
|                           |                 |         |          | ABG-7     | ENDO-XILANÁZ |       |   |
| Szárazanyag (SZA)         | (g/kg)          | 273     | 269      | 259       | *            | 259   | * |
| Hamu                      | (g/kg SZA)      | 124     | 124      | 136       | *            | 133   | * |
| Tejsav                    | (g/kg SZA)      | -       | 45,5     | 59,4      | *            | 101   | * |
| Etanol                    | (g/kg SZA)      | -       | 7,33     | 19,1      | *            | 7,81* |   |
| Ecetsav                   | (g/kg SZA)      | -       | 46,9     | 82,8      | *            | 46,6  | * |
| Nyers rost                | (g/kg SZA)      | 258     | 262      | 194       | *            | 192   | * |
| NDF                       | (g/kg SZA)      | 523     | 446      | 351       | *            | 344   | * |
| ADF                       | (g/kg SZA)      | 279     | 281      | 204       | *            | 205   | * |
| ADL                       | (g/kg SZA)      | 17,5    | 15,9     | 18,5      | *            | 17,3  |   |
| Tömegvesztés              | (g/kg SZA)      | -       | 49,9     | 76,3      | *            | 46,4  |   |
| NH <sub>3</sub> -N/össz N | (össz N tömeg%) | -       | 26       | 20        | *            | 20    | * |
| pH                        |                 | -       | 5,42     | 4,72*     |              | 4,39* |   |

\* Statisztikusan eltér a kontrolltól.  $P < 0,05$ 

Az endo-xilanáz hozzáadása a Cellulase ABG-7 készítményhez meglepő módon azzal az eredménnyel járt, hogy a silózott fűben sokkal magasabb lett a tejsav koncentráció, és ennek következtében sokkal alacsonyabb a pH.

Ezenkívül az etanolos és ecetsavas erjedés visszaszorult, valamint a szén-dioxid és az illó zsírsavak képződésének tulajdonítható tömegveszteség is kisebb lett.

5. példa:

Angol perjét készítünk elő a 2. példában leírtak szerint, majd 1 literes laboratóriumi silókban besilózzuk, és analízás előtt 3 hónapig tároljuk a környezet hőmérsékletén.

A fűhöz a következő koncentrációkban adunk endo-xilanázt: 0,010 g, 0,050 g és 0,200 g protein per kg takarmány (betárolt tömeg) (a protein meghatározás Bradford módszerével történt - lásd fentebb).

Az eredményeket az 5. táblázatban mutatjuk be.

5. táblázat

A fű és a szilázsok átlagos (N=3) összetétele

|                           | SZILÁZS         | FŰ   | KONTROLL<br>SZILÁZS | ENDO-XILANÁZ<br>(egység/kg fű) |         |                     |
|---------------------------|-----------------|------|---------------------|--------------------------------|---------|---------------------|
|                           |                 |      |                     | 50,000                         | 250,000 | 1 x 10 <sup>6</sup> |
|                           |                 |      |                     | 263                            | 267     | 264                 |
| Szárazanyag (SZA)         | (g/kg)          | 273  | 269                 | 263                            | 267     | 264                 |
| Hamu                      | (g/kg SZA)      | 124  | 124                 | 126                            | 127     | 130                 |
| Tejsav                    | (g/kg SZA)      | -    | 45,5                | 50,0                           | 67,4    | 90,2                |
| Etanol                    | (g/kg SZA)      | -    | 7,33                | 6,54                           | 7,02    | 7,63                |
| Ecetsav                   | (g/kg SZA)      | -    | 46,9                | 48,2                           | 53,2    | 55,9                |
| Nyers rost                | (g/kg SZA)      | 258  | 262                 | 263                            | 246     | 219                 |
| NDF                       | (g/kg SZA)      | 523  | 446                 | 438                            | 417     | 374                 |
| ADF                       | (g/kg SZA)      | 279  | 281                 | 283                            | 267     | 236                 |
| ADL                       | (g/kg SZA)      | 17,5 | 15,9                | 16,8                           | 16,8    | 16,7                |
| Tömegvesztés              | (g/kg SZA)      | -    | 49,9                | 51,4                           | 54,0    | 53,2                |
| NH <sub>3</sub> -N/össz N | (össz N tömeg%) | -    | 26                  | 27                             | 27      | 27                  |
| pH                        |                 | -    | 5,42                | 5,23                           | 5,03    | 4,70                |

\* Statisztikusan eltér a kontrolltól. P<0,05 (Student T-teszt)

Az 5. táblázat eredményei világosan mutatják az endo-xilánáz aktivitással való kiegészítés hatékonyságát a jobb minőségű szilázs termelésében. Az adatok szerint, ha az endo-xilánáz aktivitásból növekvő mennyiségeket adagolunk, a tejsav koncentráció lényegesen megnő a silózott fűben. Az ecetsav tartalom enyhe növekedését is észleltük. Az ecetsav és a megnövekedett tejsav tartalom felelősek az alacsony pH értékért, s ezáltal a szilázs jobb eltarthatóságáért. Az etanol termelés (a nemkívánatos élesztős erjedés következménye) nem növekedett jelentősen. Az adatok ezenkívül a sejtfal biopolimer paraméterek jelentős csökkenését mutatják (alacsonyabb nyers rost tartalom, alacsonyabb NDF tartalom és alacsonyabb ADF tartalom a kontrollal való összehasonlításban), ami a tejsav baktériumok és az endo-xilánázzal kezelt szilázst fogyasztó állat számára a fermentálható cukrok mennyiségét növeli. A sejtfal anyagának előemésztése a silózott takarmány emészthetőségének a javulását eredményezi.

**SZABADALMI IGÉNYPONTOK**

1. Endo-xilanáz tartalmú szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy 1 kg takarmány (betárolt tömeg) több, mint 50.000 egység endo-xilanázt tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy az endo-xilanázt fonalas gombából állítjuk elő.

3. A 2. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy az endo-xilanázt az *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium* és *Trichoderma* nemzetségek csoportjából kiválasztott fonalas gombából állítjuk elő.

4. A 3. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy az *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tubigenensis*, *Disporotrichum dimorphosporum* és *Trichoderma reesei* fajok csoportjából kiválasztott fonalas gombából állítjuk elő.

5. Az 1. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy az endo-xilanáz pH optimuma pH 3,5 - 6,0 tartományon belül van.

6. Az 1. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy tejsavbaktérium inokulumot is tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* és *Lactobacillus lactis* által alkotott csoportból választott tejsavbaktériumot tartalmaz.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti szilázs készítmény, azzal jellemezve, hogy olyan endo-xilanáz készítménnyel egészítjük ki a takarmányt, mely lényegében más enzimeket nem tartalmaz.

9. Eljárás szilázs tartósítására, azzal jellemezve, hogy a szilázst annyi endo-xilanáz aktivitással egészítjük ki, amennyi hatékonyan növeli a szilázsban lévő vízoldható szénhidrátok mennyiségét a tejsav baktériumok számára tejsav és ecetsav termelésükhöz.

10. Eljárás szilázstakarmány in vivo emészthetőségének javítására állatokban, azzal jellemezve, hogy az állatot olyan szilázst tartalmazó étrenden tartjuk, amelyet annyi endo-xilanáz aktivitással egészítettünk ki, amennyi hatékonyan — legalább részben — bontja a növényi sejtfalat.

11. Eljárás szilázstakarmány tápértékének javítására, azzal jellemezve, hogy a szilázst annyi endo-xilanáz aktivitással egészítjük ki, amennyi hatékonyan szabadítja fel a besilózott növényi anyagból a vízoldható szénhidrátokat a szilázst fogyasztó állatok számára.

12. Endo-xilanáz felhasználása szilázs előállításában.

13. Legalább 50 tömegszázalék endo-xilanázt tartalmazó készítmény, melyet szilázs kezelésére használunk.

14. Szilázstakarmány, melyet több mint 50.000 egység endo-xilanáz/kg (betárolt tömeg) takarmány mennyiséggel kezelünk.

15. Állati takarmány készítmény, mely a 14. igénypont szerinti szilázst tartalmazza.

A meghatalmazott:

Fellegay László  
1980. évi 10. sz. törvény  
az S.B.S. 9. §. Budapesti Nemzetközi  
Kereskedelmi Kereskedelmi  
Kereskedelmi Kereskedelmi u. 10.  
1980. évi 10. sz. törvény 15-3664

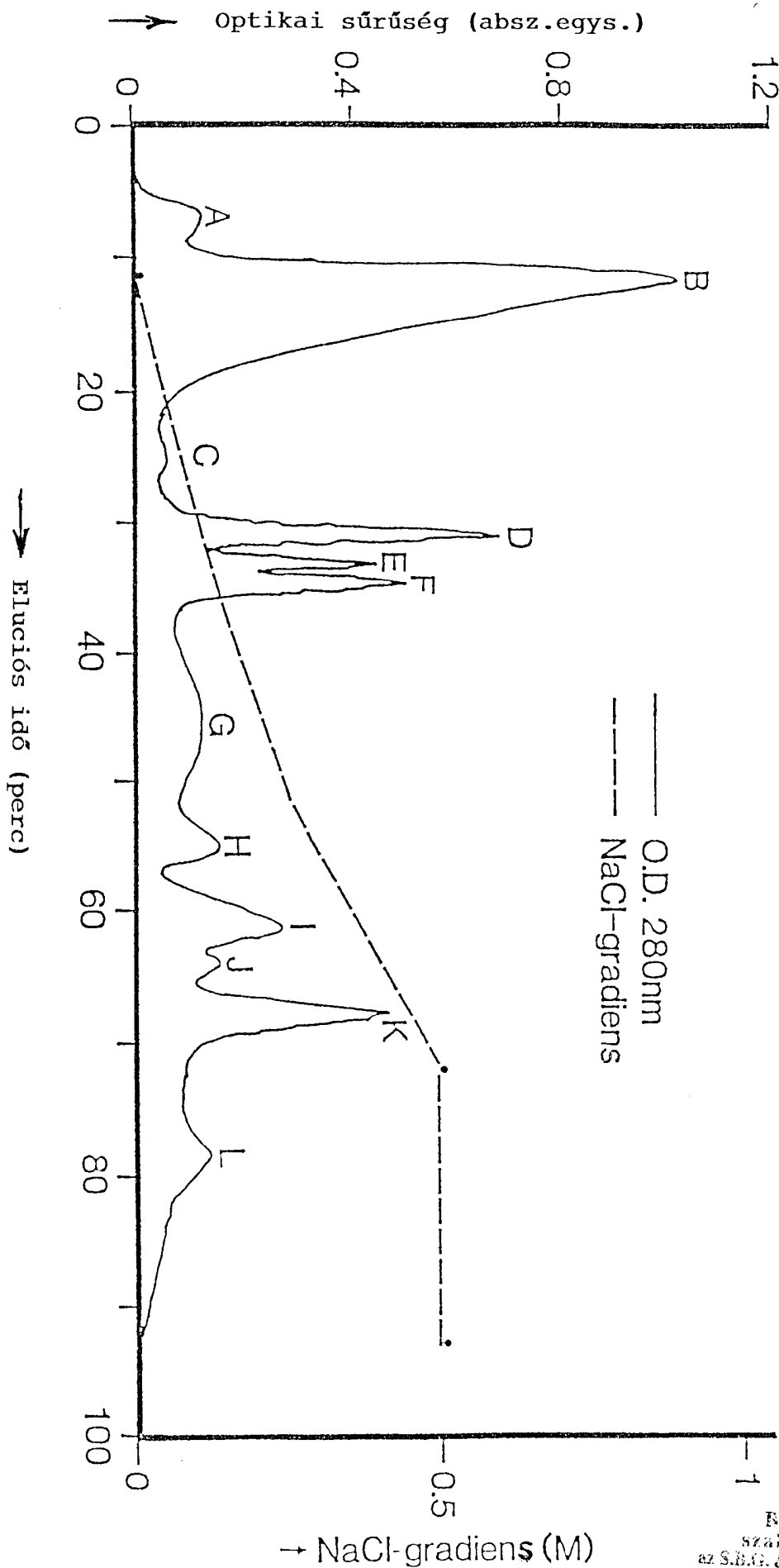
26 oldal + 1 a) Szavakkal  
Földvár

960/92

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

55.971/BE

1/1



1. ábra

Belényi László  
szabványügyi ügyvivő  
az S.B.G. & I. Államközi Nemzetközi  
Szabványügyi Tanácsnál  
H-1051 Budapest, Rákóczi u. 10.  
Telefon: 153-3735, Fax: 153-2664