РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 763 378**(13) **C2**

(51) МПК
A23K 20/189 (2016.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 20/189 (2021.08)

(21)(22) Заявка: **2019111908, 15.09.2017**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.09.2017

Дата регистрации:
28.12.2021

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
23.09.2016 US 62/398,741

(43) Дата публикации заявки: **23.10.2020** Бюл. № **30**

(45) Опубликовано: **28.12.2021** Бюл. № **1**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **23.04.2019**

(86) Заявка PCT:
US 2017/051758 (15.09.2017)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2018/057420 (29.03.2018)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ЮЙ, Шукунь (SE),
КРАГХ, Карстен Маттиас (DK),
ЛИ, Вэньтин (GB)

(73) Патентообладатель(и):
ДЮПОН НЬЮТРИШН БАЙОСАЙЕНСИЗ АПС (DK)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2015128366 A3, 03.09.2015. US 20030165487 A1, 04.09.2003. WO 2008006881 A1, 17.01.2008. WO 2014099416 A1, 26.06.2014. WO 2013169645 A1, 14.11.2013. RU 2529949 C2, 10.10.2014. RU 2277345 C1, 10.06.2006. RU 2129609 C1, 27.04.1999.**

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВНЫХ ПРИ НИЗКОМ ЗНАЧЕНИИ pH АЛЬФА-1,4/1,6-ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ В КАЧЕСТВЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ КРАХМАЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии. Предложенный способ увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы у жвачного животного включает добавление по меньшей мере одной альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы (GLCH), выбранной из α-амилазы из источника Aspergillus kawachii (AkAA) и α-амилазы из источника Aspergillus Clavatus (AcAA), в качестве кормовой добавки в корм для жвачного животного. Указанная гидролаза (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью гидролазы при значении pH 6 в присутствии пепсина; (b) указанная гидролаза активна в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку; (c) гидролаза действует совместно с пищеварительными ферментами,

RU 2763378 C2

присутствующими в пищеварительных камерах жвачного животного, с обеспечением увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы. Также предложен способ увеличения перевариваемости крахмала, увеличения выхода глюкозы, увеличения переваривания сухого вещества и увеличения газообразования во время ферментации у жвачного животного за счет добавления в корм композиции на основе ферментов, содержащей указанную гидролазу и по меньшей мере одну протеазу, выбранную из пепсина, панкреатина, бациллолизина (P7L) и термолизина (P14L). Изобретение направлено на увеличение перевариваемости крахмала и выхода глюкозы. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 11 ил., 19 табл., 19 пр.

RU 2763378 C2

RU 2763378 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 763 378**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A23K 20/189 (2016.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A23K 20/189 (2021.08)

(21)(22) Application: **2019111908, 15.09.2017**

(24) Effective date for property rights:
15.09.2017

Registration date:
28.12.2021

Priority:
(30) Convention priority:
23.09.2016 US 62/398,741

(43) Application published: **23.10.2020** Bull. № **30**

(45) Date of publication: **28.12.2021** Bull. № **1**

(85) Commencement of national phase: **23.04.2019**

(86) PCT application:
US 2017/051758 (15.09.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/057420 (29.03.2018)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
YU, Shukun (SE),
KRAGH, Karsten Matthias (DK),
LI, Wenting (GB)

(73) Proprietor(s):
DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

RU 2763378 C2

(54) USE OF ALPHA-1,4/1,6-GLYCOSIDE HYDROLASE ACTIVE AT LOW pH AS FEED ADDITIVE FOR RUMINANTS TO IMPROVE STARCH DIGESTION

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: proposed method for increasing starch digestibility and glucose yield in a ruminant animal includes the addition of at least one alpha-1,4/1,6-glycoside hydrolase (GLCH) selected from α-amylase from an Aspergillus kawachii (AkAA) source and α-amylase from an Aspergillus Clavatus (AcAA) source as a feed additive in ruminant animal feed. The specified hydrolase (a) is characterized by at least 20% activity at a pH value of 3 or less in the presence of pepsin compared to hydrolase activity at a pH value of 6 in the presence of pepsin; (b) the specified hydrolase is active in at least two of three digestive chambers of the ruminant animal, including the rumen, rennet and small intestine; (c) hydrolase acts together with digestive enzymes present in digestive chambers of the ruminant animal to increase the digestibility of starch and glucose yield. A method for an increase in starch digestibility, increase in glucose yield, increase in the digestion of dry substance and increase in gas formation during fermentation in a ruminant animal is also proposed by adding an enzyme-based composition containing the specified hydrolase and at least one protease selected from pepsin, pancreatin, bacillolysin (P7L) and thermolysin (P14L) to the feed.

EFFECT: invention is aimed at increasing the

RU 2763378 C2

digestibility of starch and glucose yield.

4 cl, 11 dwg, 19 tbl, 19 ex

RU 2763378 C2

RU 2763378 C2

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область изобретения относится к питанию животных и, в частности, к применению активных при низком значении pH альфа–1,4/1,6–гликозидгидролаз (GLCH), таких как альфа–амилазы, глюкоамилазы и альфа–глюкозидазы, в качестве кормовой добавки для жвачных животных для улучшения переваривания крахмала.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Жвачные животные обладают уникальной способностью превращать грубый корм в белок и энергию посредством их микробных/ферментативных пищеварительных систем. Соответственно, жвачные животные играют важную роль в экологии Земли и в пищевой цепочке.

Главное различие между жвачными животными и нежвачными животными заключается в том, что желудки жвачных животных имеют четыре отдела: рубец, сетка, книжка и сычуг. В первых двух камерах, в рубце и сетке, пища смешивается со слюной и разделяется на слои твердого и жидкого материала. Твердые вещества собираются вместе с образованием жвачки или пищевого комка.

Жвачка затем отрыгивается и жуется для полного перемешивания ее со слюной и для уменьшения размера частиц. Волокно, особенно целлюлоза и гемицеллюлоза, изначально расщепляется в этих камерах микроорганизмами (главным образом бактериями, а также некоторыми простейшими, грибами и дрожжами) на три основные летучие жирные кислоты (VFA): уксусную кислоту, пропионовую кислоту и масляную кислоту. Белок и неструктурные углеводы (пектин, сахара и крахмалы) также подвергаются ферментации.

Несмотря на то, что рубец и сетка имеют различные названия, они представляют собой единое функциональное пространство, так как перевариваемая пища и может перемещаться между ними в обоих направлениях. Вместе эти камеры называются ретикуло–рубцом. Расщепленная перевариваемая пища, которая теперь находится в предназначенной для жидкой пищи нижней части ретикуло–рубца, затем переходит в следующую камеру, книжку, где вода и многие неорганические минеральные элементы поглощаются в кровоток.

После этого перевариваемая пища перемещается в истинный желудок, сычуг. Сычуг является прямым эквивалентом однокамерного желудка и перевариваемая пища переваривается здесь практически таким же образом. Перевариваемая пища, наконец, перемещается в тонкую кишку, где происходит переваривание и впитывание питательных веществ. Микроорганизмы, размножившиеся в ретикуло–рубце, также перевариваются в тонкой кишке. Ферментация продолжается в толстой кишке таким же образом, как и в ретикуло–рубце.

Ферменты для применения в качестве кормовых добавок жвачные животные главным образом представляют собой фибролитические ферменты, такие как целлюлазы, бета–глюканазы и гемицеллюлазы (таблица 1 в Beauchemin et al., 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84: 23–36). Сообщения о гидролазах крахмала для применения в отношении жвачных животных ограничены. Гидролазы крахмала группируют на эндо– и экзоамилазы.

Эндоамилазы, также называемые альфа–амилазами (E.C. 3.2.1.1), представляют собой крахмалолитические ферменты, которые катализируют гидролиз внутренних альфа–1,4–O–гликозидных связей до полисахаридов с сохранением в продуктах альфа–аномерной конфигурации. Большинство альфа–амилаз нуждается в ионах кальция (Ca^{2+}) для своей активности, структурной целостности и стабильности.

Семейство альфа–амилаз, т. е. клан гликозидгидролаз GH–H, является крупнейшим

семейством гликозидгидролаз, трансфераз и изомераз, включающим почти 30 различных ферментативных специфичностей. Большое разнообразие ферментов способно воздействовать на крахмал. Такие ферменты можно разделить на четыре группы: эндоамилазы, экзоамилазы, деветвящие ферменты и трансферазы.

Эндоамилазы расщепляют внутренние альфа–1,4–связи с получением в результате альфа–аномерных продуктов.

Экзоамилазы расщепляют альфа–1,4– или альфа–1,6–связи внешних остатков глюкозы с получением в результате альфа– или бета–аномерных продуктов.

Деветвящие ферменты гидролизуют альфа–1,6–связи исключительно оставляя длинные линейные полисахариды.

Трансферазы расщепляют альфа–1,4–гликозидные связи донорной молекулы и переносят часть донора на гликозид–акцептор с образованием новой гликозидной связи.

Гликозидгидролазы были разделены на классы на основе их типа реакции и на семейства на основе их хорошо выраженных сходств аминокислотных последовательностей. Большинство амилолитических ферментов принадлежат к семейству GH–13. Семейство GH–13 можно дополнительно классифицировать на основе более крупной категории, называемой кланом, который характеризует трехмерную структуру каталитического модуля. Среди четырнадцати кланов (A–N), определенных для гликозидаз и трансгликозидаз, семейство альфа–амилаз (GH–13) принадлежит к восьмому клану GH–H.

Животные синтезируют и секретируют пищеварительную панкреатическую альфа–амилазу для гидролиза крахмала. Данная альфа–амилаза характеризуется оптимальным значением pH, составляющим около pH 6–7, и проявляет активность в тонкой кишке.

Добавление микробных амилаз в корм может дополнительно увеличить переваривание крахмала животными, вероятно, в связи с тем фактом, что секретируемой панкреатической амилазы недостаточно и/или прохождение корма по пищеварительному тракту тонкой кишки является довольно быстрым, вследствие чего панкреатическая амилаза не имеет достаточного времени для тщательного расщепления крахмала, особенно в случае домашней птицы. (Isaksen, M. F. Cowieson, A. J. Kragh, K. M. (2010). Starch– and protein–degrading enzymes: biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In: Enzymes in farm animal nutrition /edited by M.R. Bedford и G.G. Partridge. стр. 85–95).

Таким образом, эндоамилазы являются одними из кормовых ферментов, широко применяемых в кормовой промышленности. Наиболее распространенные применяемые кормовые амилазы получают из *Bacillus subtilis, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis* и *Aspergillus oryzae*.

Такие кормовые амилазы характеризуются оптимальной активностью в диапазоне значений pH от pH 4 до pH 8. Большинство из них характеризуются значительной устойчивостью к пепсину. Однако, такие кормовые ферменты, по–видимому, не содержат связывающий сырой крахмал домен (SBD) и, возможно, характеризуются ограниченной способностью к гидролизу нежелатинизированного сырого крахмала.

Planchot et al. (Extensive degradation of native starch granules by alpha–amylase from *Aspergillus fumigatus*, Journal of Cereal Science, том 21, Issue 2, 1995, стр. 163–171) сообщали о низкой эффективности альфа–амилазы из *Bacillus sp.* в отношении расщепления гранулированного крахмала по сравнению с панкреатической амилазой. EFSA (Scientific Opinion on the safety and efficacy of Ronozyme RumiStar (alpha–amylase) as a feed additive for

dairy cows. Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). EFSA Journal 2012;10(7):2777) сообщали о применении альфа–амилазы из *B. licheniformis* в отношении молочных коров. Эффект был в некоторых случаях заметным, и в некоторых случаях эффект был незначительным. Dettori–Campus et al. (Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. Process Biochemistry, том 27, Issue 1 января 1992 г., стр. 17–21) изучали амилазы из 16 отдельных штаммов Bacillus и продемонстрировали их предпочтительную активность в отношении растворимого крахмала, а не сырого крахмала, с наиболее высоким соотношением активности в отношении сырого крахмала и растворимого крахмала, составляющим 0,25 для штамма *B. amylolyticus*.

Tricarico et al. (Dietary supplementation of ruminant diets with an Aspergillus oryzae alpha–amylase. Animal Feed Science and Technology. Том 145, Issues 1–4, 14 августа 2008 г., стр. 136–150) рассмотрели применение альфа–амилазы из *Aspergillus oryzae* в качестве пищевой добавки в рационы жвачных животных и предположили, что данная добавка на основе амилазы может улучшить производительность животных посредством модифицирования рубцового переваривания крахмала без необходимости усиления переваривания крахмала в рубце. Такой эффект вполне мог быть обусловлен ферментными примесями, так как по определению добавление амилазы, как ожидается, увеличивает переваривание крахмала (Beauchemin, Holtshausen, (2010). Developments in enzyme usage in ruminants. In: Developments in enzyme usage in ruminants. In: Enzymes in farm animal nutrition /edited by M.R. Bedford и G.G. Partridge. стр. 206–230).

Monteiro de Souza et al. (Application of microbial alpha–amylase in industry – a review. Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: 850–861) рассмотрели альфа–амилазы промышленного значения и почти все из них характеризовались оптимальным значением pH выше pH 5, за исключением одной из *Aspergillus kawachii*, которая характеризовалась оптимальным значением pH и стабильностью при 3,0. Именно амилазу *A. kawachii* применяли совместно с глюкоамилазой для одновременного разжижения и ферментации кукурузного крахмала до биоэтанола ввиду ее способности расщеплять сырой крахмал или гранулированный крахмал (Dunn–Coleman et al., 2008, US 7354752 B2).

Перевариваемость крахмала в кормах значительно варьирует и зависит от ряда факторов, в том числе физической структуры как крахмала, так и кормовой основы.

В публикации заявки на патент США 2005/0037053, опубликованной 17 февраля 2005 г., раскрыто применение фермента, характеризующегося амилолитической активностью и способного к расщеплению устойчивого крахмала в корме, содержащем крахмал для животных с однокамерным желудком, таких как домашняя птица и свиньи.

В WO 2008/06881, опубликованной 17 января 2008 г., раскрыто применение бактериальных амилаз в корме для жвачных животных подсемейства бычьих для улучшения удоев молока, кажущейся перевариваемости скармливаемого рациона, перевариваемости сухого вещества кормового продукта, прироста веса и/или коэффициента кормоотдачи.

В WO 2015/128366, опубликованной 3 сентября 2015 г., раскрыто применение бактериальных амилаз в комбинации с одной или несколькими протеазами в корме для жвачных животных подсемейства бычьих для улучшения перевариваемости маиса и/или маисового силоса, в частности для улучшения удоев молока, прироста веса и/или коэффициента кормоотдачи.

Соответственно, все еще существует необходимость в увеличении перевариваемости крахмала, увеличении выхода глюкозы, увеличении переваривания сухого вещества и/или газообразования для жвачных животных.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте осуществления раскрыт способ увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы у жвачного животного, который включает добавление по меньшей мере одной альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы (GLCH) в качестве кормовой добавки в корм для жвачного животного, где указанная гидролаза (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью гидролазы при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанная гидролаза активна в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) гидролаза действует совместно с пищеварительными ферментами, присутствующими в пищеварительных камерах жвачного животного, с обеспечением увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы.

Во втором варианте осуществления по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в рубце или сычуге.

В третьем варианте осуществления гидролаза выбрана из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и альфа–глюкозидаз. Предпочтительно группа состоит из

альфа–амилаз и глюкоамилаз.

В четвертом варианте осуществления альфа–амилазы являются членами семейства GH 13 или выбраны из группы, состоящей из альфа–амилазы (EC 3.2.1.1); пуллуланазы (EC 3.2.1.41); цикломальтодекстрин–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.19); цикломальтодекстриназы (EC 3.2.1.54); трегалозо–6–фосфатгидролазы (EC 3.2.1.93); олиго–альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.10); мальтогенной амилазы (EC 3.2.1.133); неопуллуланазы (EC 3.2.1.135); альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); мальтотетраозо–образующей альфа–амилазы (EC3.2.1.60); изоамилазы (EC 3.2.1.68); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); мальтогексаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.98); мальтотриозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.116); ветвящего фермента (EC 2.4.1.18); трегалозосинтазы (EC 5.4.99.16); 4–альфа–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.25); мальтопентаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.–) ; амилосахаразы (EC 2.4.1.4) ; сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7); мальтоолигозилтрегалозо–трегалоги дролазы (EC 3.2.1.141); изомальтулозосинтазы (EC 5.4.99.11); мальтоолигозилтрегалозосинтазы (EC 5.4.99.15); амило–альфа–1,6–глюкозидазы (EC 3.2.1.33) и альфа–1,4–глюкан:фосфат–альфа–мальтозилтрансферазы (EC 2.4.99.16).

В пятом варианте осуществления глюкозидазы являются членами семейства GH 13 или GH31 или выбраны из группы, состоящей из альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); альфа–галактозидазы (EC 3.2.1.22); альфа–маннозидазы (EC 3.2.1.24); альфа–1,3–глюкозидазы (EC 3.2.1.84); сахаразы–изомальтазы (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); альфа–ксилозидазы (EC 3.2.1.177); альфа–глюканлиазы (EC 4.2.2.13); изомальтозилтрансферазы (EC 2.4.1.–); олигосахарид–альфа–1,4–глюкозилтрансферазы (EC 2.4.1.161); сульфохиновозидазы (EC 3.2.1.–).

В шестом варианте осуществления глюкоамилазы являются членами семейства GH15 или выбраны из группы, состоящей из глюкоамилазы (EC 3.2.1.3); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); альфа–трегалазы (EC 3.2.1.28) и декстрандекстриназы (EC 2.4.1.2).

В седьмом варианте осуществления раскрыт способ увеличения перевариваемости крахмала, увеличения выхода глюкозы, увеличения переваривания сухого вещества и увеличения газообразования во время ферментации у жвачного животного, включающий добавление в корм композиции на основе ферментов, содержащей (i) по меньшей мере

один фермент GLCH в качестве кормовой добавки для жвачного животного, где указанный фермент (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанный фермент активен в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) фермент действует совместно с панкреатической амилазой с обеспечением увеличения выхода глюкозы, и (ii) по меньшей мере одну протеазу.

В девятом варианте осуществления по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала.

В десятом варианте осуществления фермент GLCH выбран из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и альфа–глюкозидаз. Предпочтительно фермент выбран из группы, состоящей из альфа–амилаз и глюкоамилаз.

В одиннадцатом варианте осуществления по меньшей мере один фермент GLCH выбран из группы, состоящей из альфа–амилазы (EC 3.2.1.1); пуллуланазы (EC 3.2.1.41); цикломальтодекстрин–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.19); цикломальтодекстриназы (EC 3.2.1.54); трегалозо–6–фосфатгидролазы (EC 3.2.1.93); олиго–альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.10); мальтогенной амилазы (EC 3.2.1.133); неопуллуланазы (EC 3.2.1.135); альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); мальтотетраозо–образующей альфа–амилазы (EC3.2.1.60); изоамилазы (EC 3.2.1.68); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); мальтогексаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.98); мальтотриозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.116); ветвящего фермента (EC 2.4.1.18); трегалозосинтазы (EC 5.4.99.16); 4–альфа–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.25); мальтопентаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.–) ; амилосахаразы (EC 2.4.1.4) ; сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7); мальтоолигозилтрегалозы–трегалогидролазы (EC 3.2.1.141); изомальтулозосинтазы (EC 5.4.99.11); мальтоолигозилтрегалозосинтазы (EC 5.4.99.15); амило–альфа–1,6–глюкозидазы (EC 3.2.1.33) и альфа–1,4–глюкан:фосфат–альфа–мальтозилтрансферазы (EC 2.4.99.16).

В двенадцатом варианте осуществления глюкозидазы выбраны из группы, состоящей из альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); альфа–галактозидазы (EC 3.2.1.22); альфа–маннозидазы (EC 3.2.1.24); альфа–1,3–глюкозидазы (EC 3.2.1.84); сахаразы–изомальтазы (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); альфа–ксилозидазы (EC 3.2.1.177); альфа–глюканлиазы (EC 4.2.2.13); изомальтозилтрансферазы (EC 2.4.1.–); олигосахарид–альфа–1,4–глюкозилтрансферазы (EC 2.4.1.161); сульфохиновозидазы (EC 3.2.1.–).

В тринадцатом варианте осуществления глюкоамилазы выбраны из семейства гликозилгидролаз GH15.

В четырнадцатом варианте осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из кислой протеазы или нейтральной металлопротеазы, и предпочтительно протеаза представляет собой грибную аспарагиновую протеазу или бактериальную нейтральную металлопротеазу.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 изображено высвобождение глюкозы и мальтозы из кукурузной муки посредством альфа–амилазы AkAA в присутствии пепсина и AFP–протеазы (пример 2).

На фигуре 2 изображено высвобождение глюкозы, мальтозы и мальтотриозы из кукурузной муки посредством альфа–амилазы AkAA и панкреатина и синергия AkAA и панкреатина в отношении увеличения высвобождения глюкозы и снижения высвобождения мальтотриозы (пример 4).

На фигуре 3 показана активность альфа–амилазы AtAA в отношении кукурузной

муки в присутствии пепсина при значении pH 2,5, и панкреатина при значении pH 6,7 и полное превращение мальтотриозы при совместном дозировании AtAA и панкреатина (пример 5).

На фигуре 4 показана стабильность альфа–амилаз AkAA и AcAA и их смеси с глюкоамилазами TrGA и CS4 и аспартильной протеазой при инкубации с рубцовым соком (пример 6).

На фигуре 5 показана активность альфа–амилаз AkAA и AcAA в присутствии пепсина, протестированная при значениях pH 3,2–6,0 (пример 7).

На фигуре 6 показана активность смесей ферментов, содержащих альфа–амилазы AkAA, AcAA, и глюкоамилазу TrGA, CS4, и аспартильную пептидазу AFP, в присутствии панкреатина (пример 8).

На фигуре 7 показано взаимодействие глюкоамилазы с панкреатином в отношении увеличения гидролиза гранул кукурузного крахмала (пример 10).

На фигуре 8 показано взаимодействие глюкоамилазы с панкреатином в отношении увеличения гидролиза кукурузной муки (пример 10).

На фигуре 9 показано высвобождение глюкозы из гранул кукурузного крахмала посредством дрожжевой мальтазы (альфа–глюкозидазы) в присутствии фиксированного количества панкреатина (пример 13).

На фигуре 10 показана стабильность пяти альфа–глюкозидаз в рубцовом соке и взаимодействие с панкреатином при высвобождении глюкозы (пример 15).

На фигуре 11 показано взаимодействие пяти альфа–глюкозидаз с панкреатином при высвобождении глюкозы при значении pH 6,0 (пример 16).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все цитируемые патенты, заявки на патенты и публикации включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В данном раскрытии используют ряд терминов и сокращений. Если четко не указано иное, то применяют следующие определения.

Подразумевается, что формы единственного числа элемента или компонента являются неограничивающими в отношении числа примеров (т. е. случаев) элемента или компонента. Поэтому формы единственного числа следует понимать как включающие одно или по меньшей мере одно, а форма единственного числа для обозначения элемента или компонента также включает множественное число, за исключением случаев, когда явно подразумевается единственное число.

Термин "включающий" означает наличие установленных признаков, целых чисел, стадий или компонентов, которые изложены в формуле изобретения, но так, чтобы он не исключал наличие или добавление одного или нескольких признаков, целых чисел, стадий, компонентов или групп из них. Термин "включающий" подразумевают как включающий варианты осуществления, охватываемые терминами "по сути состоящий из" и "состоящий из". Подобным образом, термин "по сути состоящий из" подразумевают как включающий варианты осуществления, охватываемые термином "состоящий из".

Все диапазоны, при наличии таковых, являются включающими и комбинируемыми. Например, при упоминании диапазона "от 1 до 5" упомянутый диапазон следует рассматривать как включающий диапазоны "от 1 до 4", "от 1 до 3", "1–2", "1–2 и 4–5", "1–3 и 5" и т. п.

Используемый в данном документе в отношении числового значения термин "приблизительно" относится к диапазону +/– 0,5 от числового значения, если указанный термин иным образом конкретно не определен в контексте. Например, фраза "значение pH, составляющее приблизительно 6" относится к значениям pH от 5,5 до 6,5, если

конкретно не определено иное значение pH.

Подразумевается, что каждая максимальная числовая граница, раскрываемая в настоящем описании, включает каждую нижнюю числовую границу, как если бы такие нижние числовые границы были бы явно приведены в данном документе. Каждая минимальная числовая граница, раскрываемая в настоящем описании, будет включать каждую верхнюю числовую границу, как если бы такие верхние числовые границы были бы явно приведены в данном документе. Каждый числовой диапазон, приведенный в настоящем описании, будет включать каждый более узкий числовой диапазон, который находится в пределах такого более широкого числового диапазона, как если бы такие более узкие числовые диапазоны были явно приведены в данном документе.

Термины альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы или альфа–1,4;1,6–гликозидгидролазы применяют взаимозаменяемо в данном документе ("GLCH"). Они относятся к ферментам, способным к гидролизу альфа–1,4–связей и/или альфа–1,6–связей в молекулах олигомеров или полимеров, при этом такие гликозидгидролазы (a) характеризуются по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) такие ферменты активны в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) ферменты действуют совместно с панкреатической амилазой с обеспечением увеличения выхода глюкозы. Предпочтительно такие ферменты имеют один или два связывающих углевод модуля и способны к гидролизу сырого крахмала. Предпочтительно такие ферменты, представляющие собой гликозидгидролазы, выбраны из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и/или альфа–глюкозидаз.

Термин "гликозидгидролаза" используется взаимозаменяемо с "гликозидазами" и "гликозилгидролазами". Гликозидгидролазы содействуют гидролизу гликозидных связей в сложных сахарах (полисахаридах). Вместе с гликозилтрансферазами гликозидазы образуют основной каталитический аппарат для синтеза и разрушения гликозидных связей. Гликозидгидролазы отнесены к классу EC 3.2.1 как ферменты, катализирующие гидролиз O– или S–гликозидов. Гликозидгидролазы также можно классифицировать в соответствии со стереохимическим результатом реакции гидролиза. Таким образом, их можно классифицировать как либо *сохраняющие*, либо *инвертирующие* ферменты.Гликозидгидролазы также можно классифицировать как экзо– или эндо–действующие в зависимости от того, действуют ли они на (обычно невосстанавливающем) конце или в середине, соответственно, олиго/полисахаридной цепи. Гликозидгидролазы также можно классифицировать способами, основанными на последовательности или структуре. Их обычно называют по субстрату, на который они действуют.

Термин "гликозилтрансфераза" относится к ферменту, который катализирует образование гликозидной связи между моносахаридами.

Термины "гликан" и "полисахарид" используются в данном документе взаимозаменяемо. Гликан относится к полисахариду или олигосахариду либо к углеводной части гликоконъюгата, такого как гликопротеин, гликолипид или протеогликан, даже если углевод является только олигосахаридом. Гликаны могут представлять собой гомо– или гетерополимеры из моносахаридных остатков. Они могут быть линейными или разветвленными молекулами. Гликаны могут обнаруживаться в виде прикрепленных к белкам, как в гликопротеинах и протеогликанах. Как правило, они находятся на внешней поверхности клеток. O– и N–связанные гликаны очень распространены у эукариот, но также могут быть

обнаружены, хотя и реже, у прокариот.

Термин "альфа–амилаза" применяют взаимозаменяемо с альфа–1,4–D–глюканглюканогидролазой и гликогеназой. Альфа–амилазы (EC 3.2.1.1) обычно, но не всегда, нуждаются в кальции для функционирования. Такие ферменты катализируют эндогидролиз альфа–1,4–глюкозидных связей в олигосахаридах и полисахаридах. Альфа–амилазы воздействуют на крахмал, гликоген и родственные полисахариды и олигосахариды случайным образом, освобождая восстанавливающие группы в альфа–конфигурации.

Термин "активная при низком значении pH альфа–амилаза" ("LpHAA") относится к альфа–амилазе, которая характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3,0 или меньше по сравнению с ее активностью при значении pH 6,0. Термин "глюкоамилаза" (EC 3.2.1.3) применяют взаимозаменяемо с глюкан–1,4–альфа–глюкозидазой, амилоглюкозидазой, гамма–амилазой, лизосомальной альфа–глюкозидазой, кислой мальтазой, экзо–1,4–альфа–глюкозидазой, глюкоамилазой, гамма–1,4–глюканглюкогидролазой, кислой мальтазой и 1,4–альфа–D–глюкангидролазой. Данный фермент расщепляет крайние альфа–1,4–гликозидные связи на невосстанавливающем конце амилозы и амилопектина с получением глюкозы. Он также расщепляет альфа–1,6–гликозидные связи.

Термин "альфа–глюкозидаза" (E.C. 3.2.1.20) применяют взаимозаменяемо с мальтазой, глюкоинвертазой, глюкосахаразой, мальтазой–глюкоамилазой, альфа–глюкопиранозидазой, глюкозидоинвертазой, альфа–D–глюкозидазой, альфа–глюкозидгидролазой, альфа–1,4–глюкозидазой и альфа–D–глюкозидгидролазой. Данный фермент гидролизует концевые невосстанавливающие (1–4)–связанные остатки альфа–глюкозы с высвобождением одной молекулы альфа–глюкозы. Альфа–глюкозидаза представляет собой углевод–гидролазу, которая высвобождает альфа–глюкозу, а не бета–глюкозу.

Термин "корм" используется в отношении продуктов, которыми кормят животных при выращивании сельскохозяйственных животных. Термины "корм" и "корм для животных" используются взаимозаменяемо. В предпочтительном варианте осуществления пищевой продукт или корм подходит для потребления нежвачными и жвачными животными.

Используемый в данном документе термин "пробиотик" ("DFM") является источником живых (жизнеспособных) встречающихся в природе микроорганизмов. Категории DFM включают Bacillus, молочнокислые бактерии и дрожжи. Bacillus представляют собой уникальные грамположительные палочки, которые образуют споры. Эти споры очень стабильны и могут выдерживать такие условия окружающей среды, как тепло, влагу и определенный диапазон pH. Эти споры прорастают в активные вегетативные клетки при проглатывании животным и могут быть использованы в тонкоизмельченных и гранулированных рационах. Молочнокислые бактерии представляют собой грамположительные кокки, продуцирующие молочную кислоту, которые являются антагонистами патогенов. Поскольку молочнокислые бактерии, по–видимому, до некоторой степени являются чувствительными к нагреванию, их не используют в гранулированных рационах. Молочнокислые бактерии включают род *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus.* Дрожжи не являются бактериями. Эти микроорганизмы относятся к группе растений, называемой грибы.

Используемый в данном документе термин "протеаза" относится к ферменту, способному расщеплять пептидную связь. Термины "протеаза", "пептидаза" и "протеиназа" могут использоваться взаимозаменяемо. Протеазы могут быть обнаружены

у животных, растений, бактерий, архей и вирусов. Протеолиз может обеспечиваться с помощью ферментов, которые в настоящее время разделены на шесть широких групп: аспарагиновые протеазы, цистеиновые протеазы, сериновые протеазы, треониновые протеазы, глутаминовые протеазы и металлопротеазы.

В частности, термин "протеаза" означает домен белка или полипептида, полученного из микроорганизма, например гриба, бактерии, или из растения или животного, и который характеризуется способностью катализировать расщепление пептидных связей в одном или нескольких различных положениях главной цепи белка (например E.C. 3.4).

Термин "кислая протеаза" означает протеазу, характеризующуюся способностью к гидролизу белков в кислых условиях. Он может охватывать любое количество гидролизирующих белки средств, таких как эндопептидазы или экзопептидазы.

Термины "аспарагиновая протеаза" и "аспарагиновая кислая протеаза" применяют взаимозаменяемо в данном документе и представляют собой тип кислой протеазы. Аспарагиновые протеазы (EC 3.4.23), также известные как аспартильные протеазы, характеризуются активированной молекулой воды, связанной с одним или несколькими каталитическими остатками аспартата, для гидролиза пептидной связи в полипептидном субстрате. Как правило, они имеют два высококонсервативных аспартата в активном сайте и характеризуются оптимальной активностью при кислотных значениях pH.

Аббревиатура "AFP" относится к грибной аспарагиновой протеазе, то есть аспарагиновой протеазе, источником которой является организм гриба.

Термин "металлопротеаза" означает любую протеазу, в каталитическом механизме которой участвует металл. Для большинства металлопротеаз требуется цинк, однако некоторые используют кобальт. Ион металла скоординирован с белком посредством трех лигандов. Лиганды, координирующие ион металла, могут варьировать в отношении гистидина, глутамата, аспартата, лизина и аргинина. Четвертое координирующее положение занято активной молекулой воды.

Существуют две подгруппы металлопротеиназ, включающие (a) экзопептидазы, металлоэкзопептидазы (EC номер: 3.4.17) и (b) металлоэндопептидазы (3.4.24).

Хорошо известные металлоэндопептидазы включают белки ADAM и матриксные металлопротеиназы.

Термин "пепсин", используемый в данном документе, относится к ферменту, который расщепляет белки на более мелкие пептиды при низких значениях pH, составляющих от 2,0 до 3,5, т. е. он представляет собой протеазу, принадлежащую к семейству аспарагиновых пептидаз A1. Он продуцируется и секретируется в желудке и является одним из основных пищеварительных ферментов в пищеварительных системах людей и животных, где он способствует перевариванию белков в пище или корме.

Термин "жвачное животное", используемый в данном документе, относится к млекопитающему, которое способно получать питательные вещества из пищи растительного происхождения путем ферментирования ее в специализированном желудке перед перевариванием, главным образом, посредством воздействий микроорганизмов. Процесс как правило требует отрыгивания и повторного пережевывания ферментированного содержимого рубца (известного как жвачка). Процесс повторного пережевывания жвачки для дополнительного измельчения растительного сухого вещества и стимулирования переваривания называют жеванием жвачки. Ориентировочно 150 видов жвачных животных включают как одомашненные, так и дикие виды. Жвачные животные включают без ограничения крупный рогатый скот, коров, коз, овец, жирафов, яков, оленей, вапити, антилоп, буйволов и т. п.

Термин "пищеварительные камеры жвачного животного", используемый в данном документе, относится к рубцу, сетке, книжке, сычугу и тонкой кишке (McDonald et al., 2011, Animal Nutrition (7th Edition), стр. 156–191). Сычуг представляет собой прямой эквивалент однокамерного желудка.

Термин "фураж", используемый в данном документе, относится к типу корма для животных, представляющего собой любой сельскохозяйственный продукт питания, применяемый конкретно для кормления одомашненных сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, козы, овцы, лошади, куры и свиньи. "Фураж" относится в частности к пище, даваемой животным (в том числе к измельченным и подаваемым им растениям), в отличие от той, которую они добывают самостоятельно (что называется фуражированием). Фураж также называют кормом для скота и он включает сено, солому, силос, прессованные и гранулированные корма, масла, и смешанные рационы, и проросшие зерновые и бобовые (такие как проростки бобов, свежий солод или солодовую дробина). Большинство кормов для животных имеют растительное происхождение, однако некоторые производители добавляют к обработанным кормам ингредиенты, которые имеют животное происхождение.

Термин "корм" используется в отношении продуктов, которыми кормят животных при выращивании сельскохозяйственных животных. Термины "корм" и "корм для животных" используются взаимозаменяемо.

Термин "крахмал" используют взаимозаменяемо с "амилум". Он представляет собой полимерный углевод, состоящий из большого числа звеньев глюкозы, соединенных посредством гликозидных связей, и является наиболее распространенным запасным углеводом у растений. Таким образом, "крахмал" может относиться к любому материалу, состоящему из сложных полисахаридных углеводов растений, состоящих из амилозы и амилопектина, с формулой $(C_6H_{10}O_5)_x$, где X может быть любым числом. В частности, термин относится к любому материалу растительного происхождения, в том числе без ограничения к зерновым, травам, клубням и корням, и более конкретно пшенице, ячменю, кукурузе, ржи, рису, сорго, отрубям, маниоку, просу, картофелю, сладкому картофелю и тапиоке.

Термины "связывающий крахмал домен (SBD)" или "связывающий углевод модуль (CBM)" применяют взаимозаменяемо в данном документе. SBD можно разделить на девять семейств CBM. Являясь источником энергии, крахмал подвергается расщеплению большим числом различных амилолитических ферментов. Однако, лишь приблизительно 10% из них способны к связыванию и расщеплению сырого крахмала. Такие ферменты обычно содержат отдельную последовательность–структурный модуль, называемый связывающим крахмал доменом, который опосредует присоединение к гранулам крахмала. SBD относится к аминокислотной последовательности, которая связывается преимущественно с субстратом, представляющим собой крахмал (полисахарид), или мальтосахаридом, альфа–, бета– и гамма–циклодекстрином и т. п. Они обычно представляют собой мотивы из примерно 100 аминокислотных остатков, обнаруженные у приблизительно 10% микробных амилолитических ферментов.

Термин "каталитический домен" относится к структурному участку полипептида, который отличен от CBM и который содержит активный сайт для гидролиза субстрата.

Термин "гранулированный крахмал" относится к сырому (не подвергнутому тепловой обработке) крахмалу, например гранулированному крахмалу, который не подвергали желатинизации.

Термины "фермент, гидролизирующий гранулированный крахмал (GSH)" и "гидролитическая активность в отношении гранулированного крахмала (GSH)"

применяют взаимозаменяемо в данном документе и относятся к ферментам, которые характеризуются способностью к гидролизу крахмала в гранулированном виде в характерных для пищеварительного тракта условиях, сравнимых с условиями, обнаруживаемыми в пищеварительном тракте животных, и в частности жвачных животных.

Термин "желатинизация" относится к разрушению межмолекулярных связей молекул крахмала в присутствии воды и тепла, обеспечивая связывание участками, способными к образованию водородных связей, большего количества воды. Это приводит к необратимому растворению гранул крахмала в воде с образованием вязкой суспензии.

Термин "степень полимеризации (DP)" относится к числу мономерных звеньев в макромолекуле или молекуле полимера или олигомера. Например, он может относится к числу (n) мономерных звеньев в рассматриваемом сахариде. Примерами DP1 являются моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза. Примерами DP2 являются дисахариды, такие как мальтоза и сахароза. DP>3 обозначает полимеры со степенью полимеризации более чем 3.

Термин "выделенный" означает вещество в форме или окружении, которые не встречаются в природе. Неограничивающие примеры выделенных веществ включают: (1) любое не встречающееся в природе вещество, (2) любое вещество, включая без ограничения любую клетку–хозяина, фермент, вариант, нуклеиновую кислоту, белок, пептид или кофактор, которое по меньшей мере частично извлечено из одного или нескольких или всех встречающихся в природе компонентов, с которыми оно связано в природе; (3) любое вещество, модифицированное человеком по сравнению с этим веществом, обнаруженным в природе; или (4) любое вещество, модифицированное путем увеличения количества вещества по сравнению с другими компонентами, с которыми оно связано в природе. Термины "выделенная молекула нуклеиновой кислоты", "выделенный полинуклеотид" и "выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты" будут использоваться взаимозаменяемо и относятся к полимеру РНК или ДНК, который является одно– или двухцепочечным, необязательно содержащим синтетические, отличные от природных или измененные нуклеотидные основания. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты в форме полимера ДНК может состоять из одного или нескольких сегментов кДНК, геномной ДНК или синтетической ДНК.

Термин "очищенный" применительно к нуклеиновым кислотам или полипептидам, как правило, обозначает нуклеиновую кислоту или полипептид, которые фактически не содержат других компонентов, что определяют с помощью аналитических методик, хорошо известных из уровня техники (например, очищенный полипептид или полинуклеотид образуют отдельную полосу в электрофоретическом геле, хроматографическом элюате и/или средах, подвергаемых центрифугированию в градиенте плотности). Например, нуклеиновая кислота или полипептид, которые дают фактически одну полосу в электрофоретическом геле, являются "очищенными". Чистота очищенных нуклеиновой кислоты или полипептида составляет по меньшей мере приблизительно 50%, обычно по меньшей мере приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 99,5%, приблизительно 99,6%, приблизительно 99,7%, приблизительно 99,8% или больше (например, весовой процент в молях). Иными словами, композиция обогащена молекулой, если имеет место значительное увеличение концентрации молекулы после применения методики очистки

или обогащения. Термин "обогащенный" относится к соединению, полипептиду, клетке, нуклеиновой кислоте, аминокислоте или другому определенному материалу или компоненту, который присутствует в композиции в относительной или абсолютной концентрации, которая выше, чем в исходной композиции.

Термины "пептиды", "белки" и "полипептиды" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислот, соединенных вместе пептидными связями. "Белок" или "полипептид" содержит полимерную последовательность аминокислотных остатков. В данном раскрытии используется одно– и 3–буквенный код для аминокислот, который определен согласно IUPAC–IUB объединенным комитетом по биохимической номенклатуре (JCBN). Одна буква X относится к любой из двадцати аминокислот. Также понятно, что полипептид может быть закодирован несколькими нуклеотидными последовательностями из–за вырожденности генетического кода. Мутации могут быть названы с помощью однобуквенного кода исходной аминокислоты, за которым следует номер положения, а затем однобуквенный код вариантной аминокислоты. Например, мутация с заменой глицина (G) в положении 87 на серин (S) представлена как "G087S" или "G87S". При описании модификаций положение, за которым следуют аминокислоты, перечисленные в скобках, указывает на перечень замен в этом положении любой из перечисленных аминокислот. Например, 6(L, I) означает, что положение 6 может быть замещено лейцином или изолейцином. Также в последовательности используется косая черта (/) для обозначения замен, например, F/V указывает на то, что в конкретном положении может находится фенилаланин или валин.

Мутации могут быть названы с помощью однобуквенного кода исходной аминокислоты, за которым следует номер положения, а затем однобуквенный код вариантной аминокислоты. Например, мутация с заменой глицина (G) в положении 87 на серин (S) представлена как "G087S" или "G87S".

Термин "зрелая" форма белка, полипептида или пептида относится к функциональной форме белка, полипептида или фермента без сигнальной пептидной последовательности и пропептидной последовательности.

Термин форма белка–предшественника или пептида–предшественника относится к зрелой форме белка с пропоследовательностью, функционально связанной с амино– или карбонильным концом белка. Предшественник может также иметь "сигнальную" последовательность, функционально связанную с аминоконцом пропоследовательности. Предшественник также может иметь дополнительные полипептиды, которые вовлечены в посттрансляционную активность (например, полипептиды, отщепляемые от него с тем, чтобы оставить зрелую форму белка или пептида).

"Пропоследовательность" или "пропептидная последовательность" относится к аминокислотной последовательности между сигнальной пептидной последовательностью и зрелой последовательностью фермента (например гликозидгидролазы, как описано в данном документе), которая необходима для правильного сворачивания и секреции фермента; их иногда называют внутримолекулярными шаперонами. Расщепление пропоследовательности или последовательности пропептида приводит к образованию зрелого активного фермента, который часто экспрессируется в виде проферментов.

Термины "сигнальная последовательность" и "сигнальный пептид" относятся к последовательности аминокислотных остатков, которая может участвовать в секреции или направлении транспорта зрелой формы или формы белка–предшественника. Сигнальная последовательность обычно расположена на N–конце по отношению к

последовательности белка–предшественника или последовательности зрелого белка. Сигнальная последовательность может быть эндогенной или экзогенной. Сигнальная последовательность в норме отсутствует у зрелого белка. Сигнальная последовательность обычно отщепляется от белка сигнальной пептидазой после осуществления транспорта белка. Представляющий интерес ген может экспрессироваться с сигнальной последовательностью или без нее.

Термин "дикий тип" в отношении аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты указывает на то, что аминокислотная последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты является нативной или встречающейся в природе последовательностью. Используемый в данном документе термин "встречающийся в природе" относится к любым объектам (например, белкам, аминокислотам или последовательностям нуклеиновых кислот), обнаруживаемым в природе. И наоборот, термин "не встречающийся в природе" относится к объектам, не обнаруживаемым в природе (например, рекомбинантным нуклеиновым кислотам и белковым последовательностям, полученным в лаборатории, или модификации последовательности дикого типа).

Используемые в данном документе в отношении положений аминокислотных остатков выражения "соответствующий чему–либо", или "соответствует чему–либо", или "соответствует" относятся к аминокислотному остатку в пронумерованном положении в белке или пептиде или аминокислотному остатку, который аналогичен, гомологичен или эквивалентен пронумерованному остатку в белке или пептиде. Используемый в данном документе термин "соответствующая область", как правило, относится к аналогичному положению в родственном белке или эталонном белке.

Термины "происходящий из" и "полученный из" относятся не только к белку, продуцированному или продуцируемому штаммом рассматриваемого организма, но также к белку, кодируемому последовательностью ДНК, выделенной из такого штамма, и продуцируемому в организме–хозяине, содержащем такую последовательность ДНК. Кроме того, данный термин относится к белку, который кодируется последовательностью ДНК синтетического и/или кДНК–происхождения и который имеет отличительные характеристики рассматриваемого белка.

Термин "аминокислота" относится к основной химической структурной единице белка или полипептида. Таким образом, кодон для аминокислоты аланин, являющейся гидрофобной аминокислотой, можно заменить кодоном, который кодирует другой менее гидрофобный остаток (такой как глицин) или более гидрофобный остаток (такой как валин, лейцин или изолейцин). Аналогично, также можно ожидать, что изменения, которые приводят к замене одного отрицательно заряженного остатка на другой (как, например, аспарагиновая кислота на глутаминовую кислоту) или одного положительно заряженного остатка на другой (как, например, лизин на аргинин), дадут функционально эквивалентный продукт. Во многих случаях ожидается, что изменения нуклеотидов, которые приводят к изменениям N–концевой и С–концевой частей белковой молекулы, также не приведут к изменениям активности белка. Каждая из предложенных модификаций находится в пределах квалификации рядового специалиста в данной области техники, равно как и определение сохранения биологической активности кодируемых продуктов.

Термин "кодон–оптимизированный", относящийся к генам или кодирующим участкам молекул нуклеиновой кислоты для трансформации различных хозяев, относится к изменению кодонов в гене или кодирующих участках молекул нуклеиновой кислоты с тем, чтобы отражать обычное использование кодонов у организма–хозяина без

изменения полипептида, который кодируется ДНК.

Термин "ген" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует конкретный белок, включающей регуляторные последовательности предшествующие (5'–некодирующие последовательности) кодирующей последовательности и следующие за ней (3'–некодирующие последовательности). Термин "нативный ген" означает ген, обнаруживаемый в природе, со своими собственными регуляторными последовательностями. "Химерный ген" относится к любому гену, который не является нативным геном, содержащему регуляторные и кодирующие последовательности, которые совместно не обнаруживаются в природе. Соответственно, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из одного источника, но расположены в порядке, отличающемся от обнаруживаемого в природе. "Эндогенный ген" относится к нативному гену в его естественном расположении в геноме организма. "Чужеродный" ген относится к гену, не обнаруживаемому в норме в организме хозяина, а который введен в организм хозяина путем переноса генов. Чужеродные гены могут включать нативные гены, введенные в организм, не являющийся нативным, или химерные гены. "Трансген" представляет собой ген, который ввели в геном с помощью процедуры трансформации.

Термин "кодирующая последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует конкретную аминокислотную последовательность. "Подходящие регуляторные последовательности" относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'–некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'–некодирующие последовательности) кодирующей последовательности и которые влияют на транскрипцию,процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, сайт процессинга РНК, сайты связывания эффекторов и структуры "стебель–петля".

Термин "функционально связанный" относится к ассоциации последовательностей нуклеиновой кислоты в одной молекуле нуклеиновой кислотытаким образом, что функция одной влияет на другую. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он способен влиять на экспрессию такой кодирующей последовательности, т. е.кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора. Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Термины "регуляторная последовательность" или "контрольная последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к сегменту нуклеотидной последовательности, который способен повышать или снижать экспрессию конкретных генов внутри организма. Примеры регуляторных последовательностей включают без ограничения промоторы, сигнальную последовательность, операторы и т. п. Как отмечено выше, регуляторные последовательности могут быть функционально связаны в смысловой или антисмысловой ориентации с представляющими интерес кодирующей последовательностью/геном.

"Промотор" или "промоторные последовательности" относятся к последовательностям ДНК, которые определяют, где начинается транскрипция гена

с помощью РНК–полимеразы. Промоторные последовательности обычно располагаются непосредственно выше или на 5'–конце сайта инициации транскрипции. Промоторы можно получить целиком из нативной или встречающейся в природе последовательности или можно составлять из различных элементов, полученных из различных промоторов, обнаруженных в природе, или они даже могут содержать сегменты синтетической ДНК. Специалистам в данной области техники будет понятно, что различные промоторы могут управлять экспрессией гена в различных тканях или типах клеток или на различных стадиях развития или в ответ на различные условия окружающей среды или физиологические условия ("индуцируемые промоторы").

Выражение "3'–некодирующие последовательности" относится к последовательностям ДНК, расположенным ниже кодирующей последовательности, и включает последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию генов, такие как терминация транскрипции.

Используемый в данном документе термин "трансформация" относится к переносу или введению молекулы нуклеиновой кислоты в организм–хозяин. Молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить в виде линейной или кольцевой формы ДНК. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой плазмиду, которая реплицируется автономно, или она может интегрироваться в геном продуцирующего хозяина. Продуцирующие хозяева, содержащие трансформированную нуклеиновую кислоту, называются "трансформированными", или "рекомбинантными", или "трансгенными" организмами или "трансформантами".

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" относится к искусственной комбинации двух в ином случае отделенных друг от друга сегментов последовательностей нуклеиновых кислот, например, путем химического синтеза или манипуляции выделенными сегментами нуклеиновых кислот с помощью методик генной инженерии. Например, ДНК, в которую вставили один или несколько сегментов или генов естественным образом либо с помощью лабораторной манипуляции из отличной молекулы, из другой части той же молекулы или из искусственной последовательности, что привело к введению новой последовательности в ген и, соответственно, в организм. Термины "рекомбинантный", "трансгенный", "трансформированный", "сконструированный" или "модифицированный для экспрессии экзогенного гена" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термины "рекомбинантная конструкция", "экспрессирующая конструкция", "рекомбинантная экспрессирующая конструкция" и "кассета экспрессии" используются в данном документе взаимозаменяемо. Рекомбинантная конструкция содержит искусственную комбинацию фрагментов нуклеиновых кислот, например регуляторных и кодирующих последовательностей, не все из которых встречаются вместе в природе. Например, конструкция может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из одного источника, но расположены в порядке, отличающемся от обнаруживаемого в природе. Такую конструкцию можно использовать саму по себе или можно использовать в сочетании с вектором. Если используют вектор, тогда выбор вектора зависит от способа, который будут использовать для трансформации клеток–хозяев, что хорошо известно специалистам в данной области техники. Например, можно использовать плазмидный вектор. Специалисту в данной области техники хорошо известны генетические элементы, которые должны присутствовать в векторе для успешной трансформации, отбора и размножения клеток–хозяев. Специалисту в

данной области техники также будет понятно, что у различных независимых трансформантов могут проявляться различные уровни и паттерны экспрессии (Jones *et al.*, (1985) *EMBO J* 4:2411–2418; De Almeida *et al.*, (1989) *Mol Gen Genetics* 218:78–86), и, таким образом, для того, чтобы получить линии, характеризующиеся требуемым уровнем и паттерном экспрессии, обычно проводят скрининг множества трансформантов. Такой скрининг можно осуществлять с помощью стандартных молекулярно–биологических, биохимических и других анализов, в том числе Саузерн–анализа ДНК, нозерн–анализа экспрессии мРНК, ПЦР, количественной ПЦР в реальном времени (qPCR), ПЦР с обратной транскрипцией (RT–PCR), анализа экспрессии белков с помощью иммуноблоттинга, ферментативных анализов или анализов активности и/или фенотипического анализа.

Термины "продуцирующий хозяин", "хозяин" и "клетка–хозяин" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому организму или его клетке, независимо от того, является ли он человеком или отличным от человека, в который может быть стабильно или временно введена рекомбинантная конструкция для экспрессии гена. Этот термин охватывает любое потомство родительской клетки, которое не идентично родительской клетке из–за мутаций, возникших во время размножения.

Термин "процент идентичности" представляет собой взаимоотношение между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определенное путем сравнения последовательностей. В данной области техники "идентичность" также означает степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, в зависимости от конкретного случая, определенная по количеству совпадающих нуклеотидов или аминокислот между нитями таких последовательностей. "Идентичность" и "сходство" могут быть легко вычислены с помощью известных способов, в том числе без ограничения тех, которые описаны в *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., и Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987) и *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. и Devereux, J., eds.) Stockton Press, NY (1991). Способы определения идентичности и сходства прописаны в коде общедоступных компьютерных программ.

Используемый в данном документе термин "% идентичности", или "процент идентичности", или "PID" относится к идентичности белковой последовательности. Процент идентичности может быть определен с использованием стандартных методик, известных из уровня техники. Полезные алгоритмы включают алгоритмы BLAST (см.,Altschul et al., J Mol Biol, 215:403–410, 1990; и Karlin и Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873–5787, 1993). В программе BLAST используются несколько параметров поиска, большинство из которых выставлены на значения по умолчанию. Алгоритм NCBI BLAST находит наиболее релевантные последовательности с точки зрения биологического сходства, но не рекомендуется для запрашиваемых последовательностей из менее 20 остатков (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389–3402, 1997; и Schaffer et al., Nucleic Acids Res, 29:2994–3005, 2001). Иллюстративные параметры BLAST по умолчанию для поиска последовательностей нуклеиновой кислоты включают: пороговая длина смежных слов=11; отсечка E-значения=10; матрица замен=NUC.3.1 (соответствие= 1, несоответствие = -3); открытие гэпа=5 и продление гэпа=2. Иллюстративные

параметры BLAST по умолчанию для поиска аминокислотных последовательностей включают: размер слова=3; отсечка E- значения=10; матрица замен=BLOSUM62; открытие гэпа=11 и продление гэпа=1. Значение процента (%) идентичности аминокислотной последовательности определяется по количеству совпадающих идентичных остатков, деленному на общее количество остатков "эталонной" последовательности, включая любые гэпы, созданные программой для оптимального/максимального выравнивания. Алгоритмы BLAST обращаются к "эталонной" последовательности как к "запрашиваемой" последовательности.

Используемые в данном документе термины "гомологичные белки" или "гомологичные ферменты" относятся к белкам, которые имеют отчетливое сходство первичной, вторичной и/или третичной структуры. Гомология белка может относиться к сходству в линейной аминокислотной последовательности при выравнивании белков. Гомологичный поиск белковых последовательностей может быть выполнен с использованием BLASTP и PSI–BLAST из NCBI BLAST с порогом (отсечка E–значения) при 0,001. (Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997 Set 1;25(17):3389–402). Используя эту информацию, можно сгруппировать последовательности белков. Можно построить филогенетическое древо с использованием аминокислотных последовательностей.

Выравнивания последовательностей и расчеты процента идентичности можно произвести с помощью программы Megalign из пакета программ для расчета данных по биоинформатике LASERGENE (DNASTAR Inc., Мэдисон, Висконсин), программы AlignX из Vector NTI, версия 7.0 (Informax, Inc., Бетезда, Мериленд), или пакета открытого программного обеспечения EMBOSS (EMBL–EBI; Rice *et al.*, *Trends in Genetics* 16, (6): 276–277 (2000)). Множественное выравнивание последовательностей можно выполнить с помощью способа выравнивания Clustal (такого как CLUSTALW; например версии 1.83) (Higgins и Sharp, *CABIOS,* 5:151–153 (1989); Higgins *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680 (1994); и Chenna *et al.*, *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497–500 (2003)), доступный от Европейской молекулярно–биологической лаборатории через Европейский институт биоинформатики) с параметрами по умолчанию. Подходящие параметры для выравниваний белка в CLUSTALW включают следующие: штраф за наличие гэпа=15, продление гэпа=0,2, матрица=Gonnet (например,Gonnet250), ENDGAP белка = –1, GAPDIST белка=4 и KTUPLE=1. В одном варианте осуществления быстрое или медленное выравнивание применяют с настройками по умолчанию для медленного выравнивания. В качестве альтернативы, параметры, применяемые в способе CLUSTALW (например,версии 1.83), можно модифицировать, чтобы также использовать KTUPLE= 1, штраф за введение гэпа=10, продление гэпа=1, матрицу=BLOSUM (например,BLOSUM64), окно=5 и TOP DIAGONALS SAVED=5.

Различные аминокислотные последовательности полипептидов и полинуклеотидные последовательности раскрыты в данном документе в качестве признаков определенных аспектов. В определенных вариантах осуществления могут применяться варианты этих последовательностей, которые по меньшей мере на приблизительно 70–85%, 85–90% или 90%–95% идентичны последовательностям, раскрытым в данном документе. В качестве альтернативы, в определенных вариантах осуществления полипептидная последовательность или полинуклеотидная последовательность варианта может быть по меньшей мере на 60%, 61%, 62%,63%,64%, 65%, 66%, 67%, 68%,69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности,

раскрытой в данном документе. Аминокислотная последовательность или полинуклеотидная последовательность варианта имеет аналогичную раскрытой последовательности функцию или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% функции раскрытой последовательности.

Термин "вариант" в отношении полипептида относится к полипептиду, который отличается от указанного полипептида дикого типа, исходного или эталонного полипептида тем, что он включает одну или несколько встречающихся в природе или искусственных замен, вставок или делеций аминокислоты. Аналогично, термин "вариант" в отношении полинуклеотида относится к полинуклеотиду, который отличается нуклеотидной последовательностью от указанного полинуклеотида дикого типа, исходного или эталонного полинуклеотида. Идентичность полипептида или полинуклеотида дикого типа, исходного или эталонного полипептида или полинуклеотида будет очевидна из контекста.

Термины "плазмида", "вектор" и "кассета" относятся к внехромосомному элементу, часто несущему гены, которые не являются частью центрального метаболизма клетки, и обычно находящемуся в форме двухцепочечной ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, интегрируемые в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, в линейной или кольцевой форме, одно– или двухцепочечной ДНК или РНК, происходящей из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей соединен или подвергнут рекомбинации в уникальную конструкцию, которая способна вводить представляющий интерес полинуклеотид в клетку. "Кассета для трансформации" относится к конкретному вектору, содержащему ген и имеющему элементы в дополнение к гену, которые способствуют трансформации конкретной клетки–хозяина. Термины "кассета экспрессии" и "вектор экспрессии" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к конкретному вектору, содержащему ген и имеющему элементы в дополнение к гену, которые обеспечивают возможность экспрессии этого гена в хозяине.

Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к получению функционального конечного продукта (например, мРНК или белка) в форме белка–предшественника либо в зрелой форме. Экспрессия также может относиться к трансляции мРНК в полипептид.

Экспрессия гена подразумевает транскрипцию гена и трансляцию мРНК в белок–предшественник или зрелый белок. "Антисмысловое подавление" относится к продуцированию антисмысловых РНК–транскриптов, способных обеспечивать супрессию экспрессии целевого белка. "Косупрессия" относится к продуцированию смысловых РНК–транскриптов, способных обеспечивать супрессию экспрессии идентичных или существенно сходных чужеродных или эндогенных генов (патент США № 5231020). "Зрелый" белок относится к полипептиду, подвергнутому посттрансляционному процессингу; т. е. полипептиду, из которого удалены какие–либо пре– или пропептиды, присутствовавшие в первичном продукте трансляции. "Белок–предшественник" относится к первичному продукту трансляции мРНК; т. е. с еще присутствующими пре– и пропептидами. Пре– и пропептиды могут представлять собой без ограничения сигналы внутриклеточной локализации. "Стабильная трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма–хозяина, в том числе геномы как ядра, так и органелл, что приводит к генетически стабильному наследованию. В отличие от этого "временная трансформация"

относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в ядро или ДНК–содержащую органеллу организма–хозяина, что приводит к экспрессии гена без интеграции или стабильного наследования. Организмы–хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, называются "трансгенными" организмами.

Вектор экспрессии может быть одним из множества векторов или кассет, пригодных для трансформации подходящих продуцирующих хозяев, известных в данной области техники. Обычно вектор или кассета будет включать последовательности, управляющие транскрипцией и трансляцией соответствующего гена, селектируемый маркер и последовательности, обеспечивающие автономную репликацию или интеграцию в хромосому. Подходящие векторы, как правило, включают 5'–участок гена, который несет элементы, управляющие инициацией транскрипции, и 3'–участок фрагмента ДНК, который управляет терминацией транскрипции. Оба управляющих участка можно получить из генов, гомологичных генам трансформированной продуцирующей клетки–хозяина, и/или генов, нативных для продуцирующего хозяина, хотя такие управляющие участки могут быть получены и не таким способом.

Используемые в данном документе термины "гомологичные белки" или "гомологичные ферменты" относятся к белкам, которые имеют отчетливое сходство первичной, вторичной и/или третичной структуры. Гомология белка может относиться к сходству в линейной аминокислотной последовательности при выравнивании белков. Гомологичный поиск белковых последовательностей может быть выполнен с использованием BLASTP и PSI–BLAST из NCBI BLAST с порогом (отсечка E–значения) при 0,001. (Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997 Set 1; 25(17):3389–402). Используя эту информацию, можно сгруппировать последовательности белков. Можно построить филогенетическое древо с использованием аминокислотных последовательностей. Аминокислотные последовательности можно вводить в программу, такую как из пакета Vector NTI Advance, и древо направляющих можно создать с использованием метода присоединения соседей (NJ) (Saitou и Nei, Mol Biol Evol, 4:406–425, 1987). Конструкцию древа можно рассчитать с использованием коррекции Кимуры для расстояния последовательностей и игнорируя положения с гэпами. Программа, такая как AlignX, может отображать вычисленные значения расстояния в скобках после названия молекулы, отображаемого на филогенетическом древе.

Понимание гомологии между молекулами может выявить историю эволюции молекул, а также информацию об их функции; если новый секвенированный белок гомологичен уже охарактеризованному белку, то имеет место строгое указание на биохимическую функцию нового белка. Гомология является наиболее фундаментальной взаимосвязью между двумя объектами; две молекулы называются гомологичными, если они происходят от общего предка. Гомологичные молекулы или гомологи можно разделить на два класса: паралоги и ортологи. Паралоги представляют собой гомологи, которые присутствуют в пределах одного вида. Паралоги часто отличаются своими конкретными биохимическими функциями. Ортологи представляют собой гомологи, которые присутствуют у разных видов и имеют очень похожие или идентичные функции. Суперсемейство белков представляет собой наиболее широкую группу (клада) белков, для которых может быть выведено общее происхождение. Обычно это общее происхождение основано на выравнивании последовательности и сходстве механизма действия. Суперсемейства обычно содержат несколько семейств белков, которые характеризуются сходством последовательностей в пределах семейства. Термин "клан

белков" обычно используется для суперсемейств протеаз, основанных на системе классификации протеаз MEROPS.

Алгоритм CLUSTAL W является еще одним примером алгоритма выравнивания последовательностей (см. Thompson et al., Nucleic Acids Res, 22:4673–4680, 1994). Параметры по умолчанию для алгоритма CLUSTAL W включают следующие: штраф за открытие гэпа=10,0; штраф за продление гэпа=0,05; матрица весов выравнивания белка=серия BLOSUM; матрица весов выравнивания ДНК=IUB; отсрочка различающихся последовательностей % = 40; расстояние между гэпами=8; вес переходов в ДНК=0,50; перечень гидрофильных остатков=GPSNDQEKR; применение отрицательной матрицы=OFF; переключение специфичных для остатка штрафов=ON; переключение штрафов за гидрофильность=ON и переключение штрафов за выделение концевых гэпов=OFF. В алгоритмы CLUSTAL включены делеции, встречающиеся на любом конце. Например, вариант с делецией пяти аминокислот на любом конце (или в полипептиде) полипептида из 500 аминокислот будет характеризоваться процентной идентичностью последовательности, составляющей 99% (495/500 идентичных остатков × 100), относительно "эталонного" полипептида. Такой вариант будет охвачен вариантом, характеризующимся "по меньшей мере 99% идентичностью последовательности" относительно полипептида.

Используемый в данном документе термин "функциональный анализ" относится к анализу, который обеспечивает определение активности фермента. В некоторых вариантах осуществления данный термин относится к аналитическим системам, в которых фермент анализируют в отношении его способности функционировать в контексте его обычной функциональной активности.

Жвачные животные обладают уникальной способностью превращать грубый корм в белок и энергию посредством их микробных/ферментативных пищеварительных систем. Соответственно, жвачные животные играют важную роль в экологии Земли и в пищевой цепочке.

Главное различие между жвачным животным и нежвачным животным заключается в том, что жвачное животное имеет четырехкамерный желудок, состоящий из рубца, сетки, книжки и сычуга. Сычуг представляет собой прямой эквивалент однокамерного желудка (McDonald et al., 2011, Animal Nutrition (7th Edition), стр. 156–191).

Рубец является самым крупным отделом с объемом, составляющим 150–200 литров (40–50 галлонов).

В пищеварительной системе находятся миллиарды микроорганизмов. Они помогают корове переваривать и усваивать питательные вещества из корма. Для достижения эффективного усваивания корма и высоких удоев молока бактерии должны находиться в оптимальных условиях. Именно бактерии являются теми, кто осуществляет расщепление корма. Кормление коровы, фактически, сопряжено с кормлением микроорганизмов в ее рубце.

Процесс ферментации протекает в рубце и сетке. Рубец коровы подобен большому чану для ферментации. Более 200 различных бактерий и 20 типов простейших помогают корове усваивать волокнистые кормовые продукты и небелковые источники азота.

При ферментации микроорганизмы превращают углеводы в летучие жирные кислоты и газы. Данный процесс позволяет корове превращать целлюлозное волокно в энергию.

Среди газов, вырабатываемых в рубце во время ферментации (500–1500 литров в день) (150–400 галлонов), 20–40% составляют метан и диоксид углерода. Выработка ферментационных газов представляет собой значительную потерю энергии. Определенные модификаторы ферментации, такие как ионофоры, улучшают

энергетическую эффективность жвачных животных путем уменьшения таких потерь энергии на выработку газов.

Ферментационные газы удаляются путем отрыжки. Если отрыжка невозможна или неэффективна, коровы могут страдать от вздутия. При поступлении корма в рубец он наслаивается на рубцевой мат, который держится на поверхности содержимого рубца. Посредством ритмических сокращений стенки рубца свежесъеденный материал накапливается в тыльной области мата. Рубцевой мат состоит из непереваренного материала с 15% содержанием сухого вещества. Бактерии прикрепляются к корму и постепенно расщепляют ферментируемый материал. При жевании жвачки коровой отрыгиваются порции жвачки из переднего слоя. Слюна поступает в ротовую полость, и вследствие истирающего действия зубов поверхности, подвергаемые воздействию микроорганизмов, увеличиваются.

Частицы корма становиться более мелкими по мере воздействия бактерий и процесс жевания жвачки продолжается. Они постепенно абсорбируют жидкость и опускаются на дно рубца. Содержимое рубца на дне ретикуло–рубца характеризуется содержанием сухого вещества, составляющим 5%.

Сокращения рубца происходят один раз в минуту. Сокращения обеспечивают смешивание жидкого и твердого содержимого в рубце для стимулирования ферментации и избегания застоя. Сокращения также служат для высвобождения газов, удерживаемых либо в мате, либо жидкой части рубцового содержимого. Ферментационные газы затем высвобождаются посредством отрыжки. Нарушение данного процесса может приводить к вздутию. Частицы корма соответствующего размера и плотности переходят в жидкость в сетке посредством сокращений рубца. Последующие сокращения проталкивают такие частицы и некоторое количество жидкого содержимого из ретикуло–рубца в книжку.

Рубец и сетка по сути представляют собой один отдел, но с различными функциями. Хотя большая часть ферментирующего действия происходит в рубце, сетка служит в качестве промежуточной зоны для прохождения в книжку или отрыгивания.

Идеальное значение pH в рубце составляет от 6 до 7. Микроорганизмы рубца являются наиболее жизнеспособными в пределах данного диапазона. Если значение pH слишком варьирует, некоторые типы микроорганизмов погибают и это снижает усваивание корма. Микроорганизмы, которые расщепляют целлюлозу (сено, силос и т. д.) неспособны расти или ферментировать целлюлозу при значениях pH, ниже 6,0. При снижении значения pH в рубце ниже 6 рубец считают ацидозным. Рубцовый ацидоз может быть острым с быстрым сильным падением значения pH. Более распространенным среди высокопроизводительных стад является субклинический ацидоз, который характеризуется хроническими прерывающимися периодами низкого значения pH в рубце.

Как отмечалось выше, перевариваемость крахмала в кормах значительно варьирует и зависит от ряда факторов, в том числе физической структуры как крахмала, так и кормовой основы.

Было обнаружено, что перевариваемость крахмала, особенно гидролиз сырого крахмала, в рационе жвачного животного можно улучшить путем применения по меньшей мере одной альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы (GLCH) в качестве кормовой добавки для жвачного животного, где указанная гидролаза (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанные гидролазы активны в по меньшей мере двух пищеварительных камерах жвачного животного, включающих рубец, сетку, книжку и сычуг и (c) гидролаза

действует совместно с пищеварительными ферментами, присутствующими в пищеварительных камерах жвачного животного, с обеспечением увеличения выхода глюкозы и увеличения перевариваемости крахмала.

В еще одном аспекте описан способ увеличения перевариваемости крахмала, увеличения выхода глюкозы, увеличения переваривания сухого вещества и увеличения газообразования во время ферментации у жвачного животного, включающий добавление в корм композиции на основе ферментов, содержащей (i) по меньшей мере один фермент GLCH в качестве кормовой добавки для жвачного животного, где указанный фермент (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанный фермент активен в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) фермент действует совместно с панкреатической амилазой с обеспечением увеличения выхода глюкозы, и (ii) по меньшей мере одну протеазу.

Некоторые пищеварительные ферменты, присутствующие в пищеварительных камерах жвачного животного, совместно с которыми гидролаза может действовать с обеспечением увеличения выхода глюкозы, включают без ограничения амилолитические ферменты микроорганизмов рубца, пепсин или панкреатин.

Предпочтительно гидролаза способна к гидролизу сырого крахмала в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в рубце или сычуге.

Гидролаза может быть выбрана из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и альфа–глюкозидаз, или гидролаза выбрана из группы, состоящей из альфа–амилаз и глюкоамилаз.

Любую подходящую альфа–амилазу (E.C. 3.2.1.1), независимо от того, является ли она коммерчески доступной или нет, можно применять в способе, описанном в данном документе.

Иллюстративные альфа–амилазы включают без ограничения альфа–амилазу дикого типа, ее вариант или фрагмент, или генетически сконструированную гибридную альфа–амилазу, которая получена из, например, каталитического домена из одного микробного источника и крахмал–связывающего домена из другого микробного источника. Неограничивающие примеры других альфа–амилаз, которые могут являться пригодными для создания таких гибридов, можно получить из *Bacillus*, *Aspergillus, Trichoderma, Rhizopus, Fusarium, Penicillium, Neurospora* и *Humicola*.

Также можно упомянуть те альфа–амилазы, которые характеризуются гидролитической активностью в отношении гранулированного крахмала (GSH), или альфа–амилазы, которые были рекомбинантно сконструированы с обеспечением активности в отношении GSH. Такая активность в отношении GSH является преимущественной, поскольку такие ферменты расщепляют большее количество крахмала, в частности любого гранулированного (сырого) крахмала, который может присутствовать в любом корме, содержащем мелассу и т. п. Альфа–амилазы, характеризующиеся активностью в отношении GSH, включают без ограничения альфа–амилазы, полученные из *Aspergillus kawachi* (например AkAA), *Aspergillus niger* (например AnAA), *A. clavatus* (AcAA), *A. terreus* (AtAA) и *Trichoderma reesei* (например TrAA).

Альфа–амилазы AkAA, AcAA и AtAA имеют два связывающих углевод домена, один из который принадлежит к семейству связывающих углевод модулей/доменов 20 (CBM20 или CD20), в то время как другой в некоторых случаях называют вторичным сайтом связывания (SBS). SBS и CBM по–видимому функционируют путем 1) нацеливания

фермента на его субстрат, 2) направления субстрата в нишу активного сайта, 3) дестабилизации субстрата, 4) повышения процессивности, 5) аллостерической регуляции, 6) отдачи продуктов реакции и/или 7) закрепления на клеточной стенке исходного микроорганизма.

Множество таких предполагаемых функций соответствуют функциям, относящимся к некаталитическому связыванию у CBM. В отличие от CBM SBS характеризуются фиксированным положением относительно каталитического сайта, что делает их более или менее подходящими для выполнения конкретных функций (Cuyvers S., Dornez E., Delcour J. A., Courtin C. M. (2012), Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. Crit. Rev. Biotechnol. 32, 93–107).

Некоторые коммерчески доступные альфа–амилазы, которые могут характеризоваться активностью в отношении GSH, или ферменты, применяемые в способах гидролиза углеводов, являются коммерчески доступными, см., например, TERMAMYL® 120–L, LC и SC SAN SUPER®, SUPRA® и LIQUEZYME® SC, доступные от Novo Nordisk A/S, FUELZYME® LF от Verenium и CLARASE® L, SPEZYME® FRED, SPEZYME® XTRA, GC626 и GZYME® G997, доступные от Danisco, США, Inc., Genencor Division.

В других вариантах осуществления требуется, чтобы альфа–амилаза представляла собой кислотостойкую альфа–амилазу, характеризующуюся 20% активностью при значении pH, равном 3,0 или меньше по сравнению с ее активностью при значении pH 6,0

Альфа–амилазы могут быть выбраны из группы, состоящей из альфа–амилазы (EC 3.2.1.1); пуллуланазы (EC 3.2.1.41); цикломальтодекстрин–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.19); цикломальтодекстриназы (EC 3.2.1.54); трегалозо–6–фосфатгидролазы (EC 3.2.1.93); олиго–альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.10); мальтогенной амилазы (EC 3.2.1.133); неопуллуланазы (EC 3.2.1.135); альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); мальтотетраозо–образующей альфа–амилазы (EC3.2.1.60) изоамилазы (EC 3.2.1.68); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); мальтогексаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.98); мальтотриозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.116); ветвящего фермента (EC 2.4.1.18); трегалозосинтазы (EC 5.4.99.16); 4–альфа–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.25); мальтопентаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.–) ; амилосахаразы (EC 2.4.1.4) ; сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7); мальтоолигозилтрегалозы–трегалоги дролазы (EC 3.2.1.141); изомальтулозосинтазы (EC 5.4.99.11); мальтоолигозилтрегалозосинтазы (EC 5.4.99.15); амило–альфа–1,6–глюкозидазы (EC 3.2.1.33) и альфа–1,4–глюкан:фосфат–альфа–мальтозилтрансферазы (EC 2.4.99.16).

Любую подходящую глюкоамилазу (GA) (E.C. 3.2.1.3.), независимо от того, является ли она коммерчески доступной или нет, можно применять в способе, описанном в данном документе.

Пригодность глюкоамилазы (син. амилоглюкозидазы (GA) (E.C. 3.2.1.3)) будет зависеть от ее активности в отношении мальтозы. Таким образом, подходящая глюкоамилаза должна характеризоваться по меньшей мере 20% активностью в отношении мальтозы в пересчете на белок по сравнению с активностью глюкоамилазы, полученной из *Trichoderma reesei* (TrGA), при проведении анализа с 2% (вес/об.) мальтозы, pH 6,0 и 40^{o}C. TrGA широко применяют при производстве биоэтанола первого поколения ввиду ее способности генерировать глюкозу из крахмала (патент США, 2008 г., US 7413879 B2, Глюкоамилаза *Trichoderma reesei* и ее гомологи). STARGEN™ 002 представляет собой продукт на основе фермента, гидролизирующего гранулированный крахмал, для производства этанола, продаваемого DuPont.

Для питания животных важно, чтобы скорость гидролиза мальтозы до глюкозы была высокой, так как именно глюкоза абсорбируется в кровоток в пищеварительном тракте, а не ее соответствующий димер, мальтоза.

Таким образом, низкая активность глюкоамилазы *Aspergillus niger* (AnGA) в отношении мальтозы делает эту глюкоамилазу неподходящей для применения в способах, описанных в данном документе. Глюкоамилаза, как известно, имеет множество субсайтов для связывания вблизи активного сайта. Теорию субсайтов разработали для анализа сродства глюкоамилаз к субстратам. Одно из предположений данной теории заключается в том, что субстрат может связываться с ферментом либо эффективным, либо неэффективным способом. Полагают, что низкая активность глюкоамилазы *Aspergillus niger* (AnGA) может быть обусловлена вероятностью того, что мальтоза связывается с AnGA неэффективным способом. (Swanson et al., 1977, Biotechnol. Bioeng. 19:1715–1718).

Иллюстративные глюкоамилазы включают без ограничения глюкоамилазы дикого типа, их вариант или фрагмент, или генетически сконструированную гибридную глюкоамилазу, которую можно получить из, например, каталитического домена из одного микробного источника и связывающего крахмал домена из другого микробного источника. Гибридная глюкоамилаза включает, например, глюкоамилазы, содержащие каталитический домен из GA из одного организма (например, GA *Talaromyces*) и связывающий крахмал домен (SBD) из отличного организма (например, GA Trichoderma).

Такие гибридные глюкоамилазы также можно получить с применением пептида для выстраивания в ряд каталитического домена из GA из одного организма (например, GA *Talaromyces*) и связывающего крахмал домена (SBD) из отличного организма (например, GA Trichoderma).

Примеры таких гибридных глюкоамилаз включают без ограничения глюкоамилазы G1 и G2 Aspergillus niger (см., например, Boel et al., (1984) EMBO J. 3:1097–1102; WO 92/00381, WO 00/04136 и пат. США № 6352851); глюкоамилазы *Aspergillus awamori* (см., например, WO 84/02921); глюкоамилазы *Aspergillus oryzae* (см., например, Hata et al., (1991) Agric. Biol. Chem. 55:941–949) и Aspergillus shirousami. (См., например, Chen et al., (1996) Prot. Eng. 9:499–505; Chen et al. (1995) Prot. Eng. 8:575–582; и Chen et al., (1994) Biochem J. 302:275–281).

Некоторые глюкоамилазы эндогенно экспрессируются бактериями, растениями и/или грибами. Например, некоторые глюкоамилазы продуцируются несколькими штаммами нитчатых грибов.

Предпочтительно глюкоамилаза будет характеризоваться гидролитической активностью в отношении гранулированного крахмала (GSH) или была рекомбинантно сконструирована для обеспечения активности в отношении GSH. Такая активность в отношении GSH является преимущественной, поскольку такие ферменты расщепляют большее количество крахмала, в частности любого гранулированного (сырого) крахмала, который может присутствовать в любом корме, содержащем мелассу и т. п.

Глюкоамилазы, которые можно применять в способе, раскрытом в данном документе, включают глюкоамилазы, полученные из штаммов *Talaromyces* ((например, глюкоамилазы *T. emersonii, T. leycettanus, T. duponti и T. thermophilus* (см., например, WO 99/28488; пат. США № RE: 32153; пат. США № 4587215)); штаммов Trichoderma, (например, T. reesei) и глюкоамилазы, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% и приблизительно 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, раскрытой в публ. пат. США № 2006–0094080; штаммов Rhizopus, (например, R. niveus и R. oryzae); штаммов Mucor и

штаммов Humicola, ((например H. grisea (см., например, Boel et al., (1984) EMBO J. 3: 1097–1102; WO 92/00381; WO 00/04136; Chen et al., (1996) Prot. Eng. 9:499–505; Taylor et al., (1978) Carbohydrate Res. 61:301–308; пат. США № 4514496; пат. США № 4092434; пат. США № 4618579; Jensen et al., (1988) Can. J. Microbiol. 34:218–223 и SEQ ID NO: 3 WO 2005/052148)). В некоторых вариантах осуществления глюкоамилаза характеризуется по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 92%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% и приблизительно 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3 WO 05/052148. Другие глюкоамилазы, применимые в настоящем изобретении, включают глюкоамилазы, полученные из Athelia rolfsii и их варианты (см., например, WO 04/111218) и Penicillium spp. (например, Penicillium chrysogenum).

Коммерчески доступные глюкоамилазы включают без ограничения Spirizyme Ultra, Spirizyme® Achieve, Spirizyme® Fuel, SPIRIZYME® EXCEL, DISTILLASE®, OPTIDEX® L–400 и G ZYME® G990 4X, GC480, G–ZYME® 480, FERMGEN® 1–400 (Danisco США, Inc, Genencor Division), CU.CONC® (Shin Nihon Chemicals, Япония), GLUCZYME® (Amano Pharmaceuticals, Япония (см., например, Takahashi et al., (1985) J. Biochem. 98:663–671)). Второстепенные ферменты, которые находят применение в настоящем изобретении, включают три формы глюкоамилазы (например E.C. 3.2.1.3), продуцируемые Rhizopus sp., а именно "Gluc1" (MW 74000), "Gluc2" (MW 58600) и "Gluc3" (MW 61400).

Любую подходящую альфа–глюкозидазу (E.C. 3.2.1.20) можно применять как описано в данном документе.

Как отмечалось выше, альфа–глюкозидаза высвобождает глюкозу из мальтозы, изомальтозы и мальтосахаридов при нахождении в своем гидролитическом режиме. Она может также осуществлять перенос глюкозного звена на акцепторные молекулы, в том числе глюкозу, мальтозу, изомальтозу и мальтосахариды или любые другие подходящие молекулы, при нахождении в своем синтетическом режиме, особенно при более высокой концентрации субстрата и высокой концентрации продукта. В пищеварительном тракте синтетический режим или реакция переноса минимальны, так как образующийся продукт, представляющий собой глюкозу, будет удален посредством впитывания.

Протеазы (также называемые пептидазами или протеиназами) представляют собой ферменты, способные к расщеплению пептидных связей. Протеазы не раз эволюционировали и различные классы протеаз могут осуществлять одну и ту же реакцию за счет абсолютно разных каталитических механизмов. Протеазы могут быть обнаружены у животных, растений, бактерий, архей и вирусов.

Протеолиз может обеспечиваться с помощью ферментов, которые в настоящее время разделены на шесть широких групп: аспарагиновые протеазы, цистеиновые протеазы, сериновые протеазы, треониновые протеазы, глутаминовые протеазы и металлопротеазы.

Предпочтительно протеаза представляет собой кислую протеазу и более предпочтительно она представляет собой кислую грибную протеазу.

Любые кислые или нейтральные протеазы можно применять в настоящем изобретении. Например, кислые грибные протеазы включают протеазы, полученные из *Aspergillus, Trichoderma, Mucor* и *Rhizopus,* таких как *A. niger, A. awamori, A. oryzae, Trichoderma reesei и M. miehei.* AFP можно получить при экспрессии гетерологичного или эндогенного белка источниками, представляющими собой бактерии, растения и грибы. Предпочтительно AFP секретируется штаммами Trichoderma.

Иллюстративные кислые протеазы включают без ограничения кислую протеазу дикого типа, ее вариант или фрагмент, или генетически сконструированную гибридную кислую протеазу, которую можно получить из, например, каталитического домена из одного микробного источника и связывающего крахмал домена из другого микробного источника.

В другом аспекте протеаза может представлять собой нейтральную протеазу, такую как металлопротеаза (син. металлопептидаза) и более предпочтительно бактериальную металлопротеазу.

В другом аспекте предусмотрена любая выделенная рекомбинантная практически чистая полученная синтетически или не встречающаяся в природе нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой полипептид, характеризующийся любым из видов гликозидгидролазной активности, описанных в данном документе (в том числе любой слитый белок и т. д.), который был рассмотрен в данном документе выше. Также представляет интерес вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любую из гликозидгидролаз, описанных в данном документе. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что вектор может представлять собой любой подходящий вектор экспрессии и что выбор вектора может изменяться в зависимости от типа клетки, в которую предполагают вставлять вектор. Подходящие векторы включают pGAPT–PG, pRAX1, pGAMD, pGPT–pyrG1, pC194, pJH101, pE194 и pHP13 (см. Harwood и Cutting [eds.], Chapter 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons [1990]). См. также Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis* в Sonenshein et al., [eds.] *Bacillus subtilis* and Other Gram–Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], pp. 615–624) и p2JM103BBI.

Вектор экспрессии может быть одним из множества векторов или кассет, пригодных для трансформации подходящих продуцирующих хозяев, известных в данной области техники. Обычно вектор или кассета будет включать последовательности, управляющие транскрипцией и трансляцией соответствующего гена, селектируемый маркер и последовательности, обеспечивающие автономную репликацию или интеграцию в хромосому. Подходящие векторы, как правило, включают 5'–участок гена, который несет элементы, управляющие инициацией транскрипции, и 3'–участок фрагмента ДНК, который управляет терминацией транскрипции. Оба управляющих участка можно получить из генов, гомологичных генам трансформированной продуцирующей клетки–хозяина, и/или генов, нативных для продуцирующего хозяина, хотя такие управляющие участки могут быть получены и не таким способом.

Фрагменты ДНК, которые управляют терминацией транскрипции, также можно получить из различных генов, нативных для предпочтительной продуцирующей клетки–хозяина. В определенных вариантах осуществления включение участка для управления терминацией является необязательным. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии включает участок управления терминацией, полученный из предпочтительной клетки–хозяина.

Вектор экспрессии может быть включен в продуцирующего хозяина, в частности в клетки микробных продуцирующих хозяев. Продуцирующие клетки–хозяева могут быть микробными хозяевами, обнаруживаемыми среди семейств грибов или бактерий, и которые растут в широком диапазоне значений температуры, pH и устойчивости к растворителям. Например, предполагается, что любая из бактерий, водорослей и грибов, таких как нитчатые грибы и дрожжи, может соответствующим образом вмещать вектор экспрессии.

Включение вектора экспрессии в продуцирующую клетку–хозяина можно использовать для экспрессии представляющего интерес белка, так что он может находиться внутриклеточно, внеклеточно или комбинированно как внутри, так и снаружи клетки. Внеклеточная экспрессия обеспечивает более легкое извлечение требуемого белка из продукта ферментации, чем в случае способов извлечения белка, получаемого при внутриклеточной экспрессии.

Рекомбинантным вектором экспрессии может быть любой вектор, такой как плазмида или вирус, который может быть легко подвергнут процедурам рекомбинантной ДНК и привести к экспрессии нуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно зависит от совместимости вектора с продуцирующим хозяином, в который предполагают вводить вектор. Векторами могут быть линейные или замкнутые кольцевые плазмиды. Вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т. е. вектор, который существует как внехромосомный объект, репликация которого не зависит от репликации хромосом, например, плазмида, внехромосомный элемент, минихромосома или искусственная хромосома. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой такой вектор, который при введении в продуцирующего хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(хромосомами), в которую(которые) он интегрировался. Некоторые неограничивающие примеры таких векторов представлены в каталоге штаммов Fungal Genetic Stock Center (FGSC, < www.fgsc.net»). Дополнительные примеры подходящих векторов экспрессии и/или интеграции представлены в Sambrook et al.,(1989) *выше,* Ausubel (1987) *выше,* van den Hondel et al. (1991) в Bennett и Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press. 396–428 и патенте США № 5874276. Особенно подходящие векторы включают pTREX, pFB6, pBR322, PUCI8, pUCI00 и pENTR/D. Плазмиды, подходящие для применения в бактериальных клетках, включают pBR322 и pUC19, обеспечивающие осуществление репликации в *E. coli*,и pE194, например, обеспечивающую осуществление репликации в *Bacillus.*

Вкратце, что касается продуцирования в продуцирующих клетках–хозяевах можно сделать ссылку на Sambrook et al.,(1989)выше, Ausubel (1987)выше, van den Hondel et al. (1991) в Bennett и Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press (1991) pp. 70–76 и 396–428; Nunberg et al.,(1984) *Mol. Cell BioI.* 4:2306–2315; Boel et al., *(1984) 30 EMBO J.* 3:1581–1585; Finkelstein в BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein et al. Eds. Butterworth–Heinemann, Boston, MA (1992), Chap. 6; Kinghorn et al. (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London; Kelley et al.,(1985) *EMBO J.* 4:475–479; Penttila et al.,(1987) *Gene* 61: 155–164; и патент США № 5874276. Перечень подходящих векторов можно найти в каталоге штаммов Fungal Genetics Stock Center (FGSC, www at fgsc.net). Подходящие векторы включают векторы, полученные, например, от Invitrogen Life Technologies и Promega. Конкретные векторы, подходящие для применения в грибных клетках–хозяевах, включают такие векторы, как pFB6, pBR322, pUC 18, pUC100, pDON™201, pDONR™221, pENTR™, pGEM®3Z и pGEM®4Z.

Векторная система может представлять собой один вектор или плазмиду или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат полную ДНК, подлежащую введению в геном клетки–хозяина, или транспозон.

Вектор также может содержать один или несколько селектируемых маркеров для обеспечения легкого отбора трансформированных клеток. Селектируемым маркером является ген, продукт которого обеспечивает биоцидную или вирусную резистентность и т. п. Примеры селектируемых маркеров включают таковые, которые придают

противомикробную резистентность. Маркеры, связанные с питанием, также находят применение в настоящем изобретении, в том числе те маркеры, которые известны из уровня техники как *amdS*, *argB* и *pyr4*. Маркеры, пригодные для трансформации *Trichoderma*, известны из уровня техники (см., например, Finkelstein, chapter 6 в Biotechnology of Filamentous Fungi, Finkelstein et al., EDS Butterworth–Heinemann, Boston, MA (1992) и Kinghorn et al., (1992) Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London). В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии также будут включать репликон, ген, кодирующий резистентность к антибиотикам, для обеспечения отбора бактерий, несущих рекомбинантные плазмиды, и уникальные сайты рестрикции в несущественных участках плазмиды для обеспечения возможности вставки гетерологичных последовательностей. Выбор конкретного гена резистентности к антибиотикам не является критическим; подходит любой из множества генов резистентности, известных из уровня техники. Прокариотические последовательности предпочтительно выбирают так, чтобы они не мешали репликации или интеграции ДНК в *Trichoderma reesei*.

Вектор также может содержать элемент(элементы), обеспечивающий (обеспечивающие) возможность стабильной интеграции вектора в геном продуцирующего хозяина или автономной репликации вектора в продуцирующем хозяине независимо от генома клетки. Для интеграции в геном клетки–хозяина вектор может опираться на нуклеотидную последовательность, кодирующую аспарагиновую протеазу, или любой другой элемент вектора для стабильной интеграции вектора в геном путем гомологичной или негомологичной рекомбинации.

Для автономной репликации вектор может дополнительно содержать точку начала репликации, позволяющую вектору автономно реплицироваться в продуцирующем хозяине.

Более одной копии нуклеотидной последовательности, кодирующей гликозидгидролазу, можно вставить в продуцирующего хозяина с обеспечением увеличения ее продуцирования. Увеличение количества копий нуклеотидной последовательности можно получить путем интеграции по меньшей мере одной дополнительной копии последовательности в геном продуцирующего хозяина или путем включения амплифицируемого селектируемого маркерного гена, и при этом дополнительные копии нуклеотидной последовательности можно отобрать при культивировании продуцирующих клеток–хозяев в присутствии подходящего селектирующего средства.

Вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из гликозидгидролаз, вводят в продуцирующего хозяина таким образом, что вектор поддерживается в виде интегрированного в хромосому элемента или в виде самореплицирующегося внехромосомного вектора. Как правило, интеграция рассматривается как преимущество, поскольку нуклеотидная последовательность с большей вероятностью будет стабильно поддерживаться продуцирующим хозяином. Интеграция вектора в хромосому продуцирующего хозяина может происходить путем гомологичной или негомологичной рекомбинации, как обсуждалось выше.

Иллюстративные векторы включают без ограничения pGXT (аналогичен вектору pTTTpyr2, описанному в опубликованной заявке согласно PCT WO2015/017256). Можно также упомянуть стандартные бактериальные векторы экспрессии, включающие бактериофаги λ и M13, а также плазмиды, такие как плазмиды на основе pBR322, pSKF, pET23D, и системы экспрессии слитых белков, такие как MBP, GST и LacZ. Также эпитопные метки могут быть добавлены к рекомбинантным белкам для обеспечения

удобных способов выделения, например, c–myc.

Примеры подходящих векторов экспрессии и/или интеграции приведены в Sambrook et al., (1989)выше, Bennett и Lasure (Eds.) More Gene Manipulations in Fungi, (1991) Academic Press pp. 70–76 и pp. 396–428 и статьях, цитируемых в ней; в патенте США № 5874276 и каталоге штаммов Fungal Genetic Stock Center (FGSC, www.fgsc.net.). Пригодные векторы могут быть получены от Promega и Invitrogen. Некоторые конкретные пригодные векторы включают pBR322, pUC18, pUC100, pDON™201, pENTR™, pGEN®3Z и pGEN®4Z. Однако можно также применять другие формы векторов экспрессии, которые выполняют эквивалентные функции и которые являются или становятся известными в данной области техники. Таким образом, для экспрессии последовательностей ДНК, раскрытых в данном документе, можно использовать большое количество комбинаций хозяин/вектор экспрессии. Например, пригодные векторы экспрессии могут состоять из сегментов хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК, таких как различные известные производные SV40 и известные бактериальные плазмиды, например, плазмиды из E. coli, в том числе col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC19 и их производные, плазмиды для более широкого диапазона хозяев, например RP4, фаговые ДНК, например, многочисленные производные фага лямбда, например NM989, и другие ДНК–содержащие фаги, например M13 и нитчатые фаги, содержащие одноцепочечную ДНК, дрожжевые плазмиды, такие как плазмида 2.mu или ее производные.

Выбор продуцирующего хозяина может представлять собой любой подходящий микроорганизм, такой как бактерии, грибы и водоросли. Обычно выбор будет зависеть от гена, кодирующего представляющую интерес гликозидгидролазу.

Примеры подходящих продуцирующих хозяев включают без ограничения бактериальные, грибные, растительные клетки и т. д. Предпочтительно, продуцирующий хозяин может быть выбран из *E. coli*, *Streptomyces*, *Hansenula*, *Trichoderma* (в частности *T. reesei*), *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Aspergillus* (в частности *A. niger*), растительной клетки и/или спор *Bacillus*, *Trichoderma* или *Aspergillus*.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент, представляющий собой гликозидгидролазу, можно применять в раскрытых в данном документе способах и композициях. В предпочтительном аспекте представлена пищевая или кормовая добавка, содержащая гликозидгидролазу, описанную в данном документе.

Множество стандартных способов трансфекции можно применять для получения линий клеток бактерий и нитчатых грибов (например *Aspergillus* или *Trichoderma*), которые экспрессируют большие количества требуемой гликозидгидролазы. Некоторые из опубликованных способов введения ДНК–конструкций в продуцирующие целлюлазу штаммы *Trichoderma* включают Lorito, Hayes, DiPietro and Harman, (1993) Curr. Genet. 24: 349–356; Goldman, VanMontagu and Herrera–Estrella, (1990) Curr. Genet. 17:169–174; и Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen и Knowles, (1987) Gene 6: 155–164, также см. патент США № 6022725; патент США № 6268328 и Nevalainen et al., "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes" в Molecular Industrial Mycology, Eds, Leong и Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) pp. 129–148; для *Aspergillus* включают Yelton, Hamer and Timberlake, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470–1474, для *Fusarium* включают Bajar, Podila and Kolattukudy, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8202–8212, для *Streptomyces* включают Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*: Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, UK, и Fernandez–Abalos et al., Microbiol 149:1623–1632 (2003), и для *Bacillus* включают Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi and Matteuzzi, (1990) FEMS Microbiol. Lett. 55: 135–138).

Однако можно применять любую из хорошо известных процедур введения

чужеродных нуклеотидных последовательностей в клетки–хозяева. Они включают применение трансфекции с фосфатом кальция, полибрена, слияния протопластов, электропорации, биолистики, липосом, микроинъекции, плазматических векторов, вирусных векторов и любых других хорошо известных способов введения клонируемой геномной ДНК, кДНК, синтетической ДНК или другого чужеродного генетического материала в клетку–хозяина (см., например, Sambrook *et al.* выше). Также применим способ трансфекции, опосредованной Agrobacterium, описанный в патенте США № 6255115. Необходимо только, чтобы конкретная применяемая процедура генетической инженерии могла обеспечить успешное введение по меньшей мере одного гена в клетку–хозяина, способную экспрессировать этот ген.

В зависимости от применяемой клетки–хозяина могут быть выполнены посттранскрипционные и/или посттрансляционные модификации. Одним из неограничивающих примеров посттранскрипционной и/или посттрансляционной модификации является "обрезание" или "усечение" полипептида. Например, это может привести к переходу гликозидгидролазы из неактивного или по сути неактивного состояния в активное состояние, как в случае пропептида, подвергающегося дополнительному посттрансляционному процессингу, в зрелый пептид, характеризующийся ферментативной активностью. В другом случае это обрезание может приводить к получению зрелой гликозидгидролазы, описанной в данном документе, и дополнительному удалению N– или C–концевых аминокислот с образованием усеченных форм, которые сохраняют ферментативную активность.

Другие примеры посттранскрипционных или посттрансляционных модификаций включают без ограничения миристоилирование, гликозилирование, усечение, липидизацию и фосфорилирование тирозина, серина или треонина. Специалисту в данной области техники будет понятно, что тип посттранскрипционных или посттрансляционных модификаций, которым может подвергаться белок, может зависеть от организма–хозяина, в котором экспрессируется белок.

Способы трансформации *Aspergillus* и *Trichoderma* описаны, например, в Yelton et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470–1474; Berka et al., (1991) в Applications of Enzyme Biotechnology, Eds. Kelly and Baldwin, Plenum Press (NY); Cao et al., (2000) *Sci.* 9:991–1001; Campbell *et al.,* (1989) *Curro Genet.* 16:53–56; Pentilla et al., *(1987) Gene* 61:155–164); de Groot et al., (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:839–842; в патенте США № 6022725; патенте США № 6268328 и Европейском патенте № 238023. Экспрессия гетерологичного белка в *Trichoderma* описана в патенте США № 6022725; патенте США № 6268328; Harkki et al. (1991); *Enzyme Microb. Technol.* 13:227–233; Harkki et al., (1989) *Bio Technol.* 7:596–603; Европейском патенте № 244234; Европейском патенте № 215594 и Nevalainen et al., *"The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes",* в MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leong и Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) pp. 129–148). Что касается трансформации штаммов *Fusarium*, ссылка также делается на *W096l00787* и Bajar et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8202–28212.

После введения вектора экспрессии в клетки трансфицированные или трансформированные клетки культивируют в условиях, способствующих экспрессии генов под управлением промоторных последовательностей. В некоторых случаях промоторная последовательность представляет собой промотор *cbh1.* Большие партии трансформированных клеток можно культивировать, как описано в Ilmen et al 1997 ("Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*." Appl. Envir. Microbiol. **63**:1298–1306).

Поглощение ДНК штаммом–хозяином *Trichoderma* sp. зависит от концентрации ионов кальция. Как правило, в поглощаемом растворе используют приблизительно 10–50 мМ CaCl2. Дополнительные подходящие соединения включают буферную систему, такую как буфер TE (10 мМ Tris, pH 7,4; 1 мМ EDTA) или 10 мМ MOPS, pH 6,0 и полиэтиленгликоль. Предполагается, что полиэтиленгликоль сливает клеточные мембраны, за счет чего обеспечивается возможность доставки содержимого среды в цитоплазму штамма из вида *Trichoderma*. Это слияние зачастую обеспечивает интеграцию нескольких копий плазмидной ДНК в хромосому хозяина.

Обычно при трансформации *Trichoderma* sp. применяют протопласты или клетки, которые были подвергнуты обработке для проницаемости, как правило, при плотности 10^5–10^7/мл, в частности 2×106/мл. Эти протопласты или клетки в объеме 100 мкл в соответствующем растворе (например,

1,2 М сорбита и 50 мМ CaCl2) можно смешать с требуемой ДНК. Как правило, в поглощаемый раствор добавляют PEG в высокой концентрации. От 0,1 до 1 объема 25% PEG 4000 можно добавлять в суспензию протопластов; однако целесообразно добавлять приблизительно 0,25 объема в суспензию протопластов. Добавки, такие как диметилсульфоксид, гепарин, спермидин, хлорид калия и т. п., также можно добавлять в поглощаемый раствор для содействия трансформации. Подобные методики доступны для других грибковых клеток–хозяев. См.,например, патент США № 6022725.

Средой, применяемой для культивирования клеток, может быть любая традиционная среда, подходящая для выращивания клетки–хозяина и обеспечения экспрессии любой из гликозидгидролаз, описанных в данном документе. Подходящие среды и компоненты сред доступны от коммерческих поставщиков или могут быть получены в соответствии с опубликованными рецептурами (например, описанными в каталогах Американской коллекции типовых культур).

В некоторых вариантах осуществления получения отработанного цельного ферментационного бульона с рекомбинантным микроорганизмом можно достичь с применением любого способа культивирования, известного из уровня техники, приводящего к экспрессии представляющего интерес фермента. Таким образом, ферментация может подразумеваться как включающая культивирование во встряхиваемой колбе, мелкомасштабную или крупномасштабную ферментацию (в том числе непрерывный, периодический, периодический с подпиткой или твердофазный типы ферментации) в лабораторных или промышленных ферментерах, выполненную в подходящей среде и в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии или выделения фермента. Термин "отработанный цельный ферментационный бульон" определяется в данном документе как нефракционированное содержимое ферментационного материала, которое включает культуральную среду, внеклеточные белки (например,ферменты) и клеточную биомассу. Понятно, что термин "отработанный цельный ферментационный бульон" также охватывает клеточную биомассу, которая была подвергнута лизису или пермеабилизации с применением способов, хорошо известных из уровня техники.

Клетки–хозяева можно культивировать в подходящих условиях, которые обеспечивают экспрессию любой из гликозидгидролаз, описанных в данном документе. Экспрессия ферментов может быть конститутивной, такой, при которой они продуцируются непрерывно, или индуцируемой, требующей стимуляции для инициирования экспрессии. В случае индуцируемой экспрессии продуцирование белка можно инициировать, когда это необходимо, путем, например, добавления в культуральную среду вещества–стимулятора, например, дексаметазона, или IPTG, или

софорозы.

Полипептиды также можно получить рекомбинантным способом в бесклеточной системе *in vitro*, такой как система ретикулоцитов кролика TNT™ (Promega). Экспрессирующий хозяин также может культивироваться в соответствующей для хозяина среде в аэробных условиях. Может быть предусмотрено встряхивание или сочетание перемешивания и аэрации, при этом продуцирование происходит при соответствующей температуре для этого хозяина, например,от приблизительно 25°C до приблизительно 75°C (например,от 30°C до 45°C), в зависимости от потребности хозяина и получения требуемой альфа–глюкозидазы. Культивирование может происходить в течение от приблизительно 12 до приблизительно 100 часов или более (и любое значение для времени в этом промежутке, например,24–72 часа). Обычно значение pH культурального бульона составляет от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,0, также в зависимости от условий культивирования, необходимых хозяину соответственно для продуцирования представляющего интерес фермента, такого как гликозидгидролаза, описанная в данном документе. В силу этого продуцирующих хозяев и трансформированные клетки можно культивировать в традиционной питательной среде. Культуральная среда для трансформированных клеток–хозяев может быть модифицирована соответствующим образом для активации промоторов и отбора трансформированных клеток. Конкретными условиями культивирования, такими как температура, pH и т. п., могут быть таковые, которые используются для клетки–хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалистов в данной области техники. Кроме того, предпочтительные условия культивирования можно найти в научной литературе, такой как Sambrook, (1982)выше; Kieser, T, MJ. Bibb, MJ. Buttner, KF Chater и D.A. Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetics. John Innes Foundation, Norwich UK; Harwood, et al., (1990) Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley и/или от Американской коллекции типовых культур (ATCC; www.atcc.org).

Любой из способов ферментации, хорошо известных в данной области техники, можно подходящим образом применять для ферментации трансформированного или производного грибного штамма, описанного выше.

Классическая периодическая ферментация представляет собой замкнутую систему, в которой композицию среды устанавливают в начале ферментации и эту композицию не изменяют в ходе ферментации. В начале ферментации среду инокулируют требуемым (требуемыми) организмом(организмами). Другими словами, весь процесс ферментации происходит без добавления каких–либо компонентов в систему ферментации в течение всего периода.

В качестве альтернативы, периодическая ферментация определяется как "периодическая" в отношении добавления источника углерода. Кроме того, часто предпринимаются попытки контролировать такие факторы, как pH и концентрация кислорода в процессе ферментации. Обычно композиции метаболитов и биомассы периодической системы постоянно изменяются вплоть до момента прекращения ферментации. В периодических культурах клетки проходят через статическую лаг–фазу в экспоненциальную фазу усиленного роста и, наконец, в стационарную фазу, где скорость роста уменьшается или останавливается. Необработанные клетки в стационарной фазе в конечном итоге погибают. Как правило, клетки в экспоненциальной фазе отвечают за основную часть продуцирования продукта. Подходящим вариантом стандартной периодической системы является система "периодической ферментации с подпиткой". В этом варианте типичной периодической системы субстрат добавляют

постепенно, по мере того, как проходит ферментация. Периодические системы с подпиткой пригодны, если известно, что катаболитная репрессия будет ингибировать метаболизм клеток, и/или в случае, когда желательно иметь ограниченное количество субстратов в ферментационной среде. Измерение фактической концентрации субстрата в периодических системах с подпиткой затруднено, и поэтому ее оценивают на основании изменений измеряемых факторов, таких как pH, растворенный кислород и парциальное давление отходящих газов, таких как CO2. Периодический и периодический с подпиткой типы ферментации хорошо известны из уровня техники.

Непрерывная ферментация является еще одним известным способом ферментации. Она представляет собой открытую систему, в которой определенную ферментационную среду непрерывно добавляют в биореактор и равное количество кондиционированной среды одновременно удаляют на переработку. При непрерывной ферментации культуры, как правило, поддерживают при постоянной плотности, где клетки преимущественно находятся в экспоненциальной фазе роста. Непрерывная ферментация позволяет модулировать один или несколько факторов, влияющих на рост клеток и/или концентрацию продукта. Например, лимитирующее питательное вещество, такое как источник углерода или источник азота, может поддерживаться на фиксированном уровне, а всем другим параметрам позволяют снижаться. В других системах ряд факторов, влияющих на рост, может изменяться непрерывно, тогда как концентрация клеток, измеряемая по мутности среды, поддерживается постоянной. В непрерывных системах стремятся поддерживать устойчивые условия роста. Таким образом, потеря клеток из–за извлечения среды должна быть пропорциональной скорости роста клеток при ферментации. Способы модуляции питательных веществ и факторов роста для непрерывных способов ферментации, а также методики увеличения до максимума скорости образования продукта хорошо известны в области промышленной микробиологии.

Методики разделения и концентрирования известны из уровня техники, и традиционные способы можно применять для получения концентрированного раствора или бульона, содержащего полипептид альфа–глюкозидазы по настоящему изобретению.

После ферментации получают ферментационный бульон, удаляют микробные клетки и различные взвешенные твердые вещества, в том числе остаточные сырьевые материалы для ферментации, с помощью традиционных методик разделения с целью получения раствора, содержащего фермент. Как правило, применяют фильтрацию, центрифугирование, микрофильтрацию, вакуум–фильтрацию во вращающемся барабане, ультрафильтрацию, центрифугирование с последующей ультрафильтрацией, экстракцией или хроматографией или подобное.

Иногда может требоваться концентрировать раствор или бульон, содержащий представляющий интерес полипептид, для оптимизации извлечения. Применение неконцентрированных растворов или бульона обычно увеличивает время инкубации для сбора осадка обогащенного или очищенного фермента.

Раствор, содержащий фермент, можно концентрировать с применением традиционных методик концентрирования до тех пор, пока не будет достигнут требуемый уровень фермента. Концентрирования раствора, содержащего фермент, можно достичь посредством любой из методик, рассмотренных в данном документе. Примеры способов обогащения и очистки включают без ограничения вакуум–фильтрацию во вращающемся барабане и/или ультрафильтрацию.

Гликозидгидролазу, описанную в данном документе, можно тестировать в отношении активности с применением ряда тестов, известных из уровня техники. Например,

активность можно тестировать путем объединения фермента с гликопротеином или олигосахаридом и водой при необходимости. Активность можно измерить путем анализа продуктов реакции, которые можно выделить и визуализировать, например, с помощью тонкослойной хроматографии или с помощью HPLC с применением колонок для анализа моносахаридов и олигосахаридов, сопряженного ферментного анализа с применением оксидазы–пероксидазы глюкозы для количественного определения глюкозы и реагента, представляющего собой 3,5–динитросалициловую кислоту (DNS), для общего анализа восстанавливающего сахара (см. примеры ниже).

Кроме того, гликозидгидролаза, описанная в данном документе, независимо от того, является ли она инкапсулированной или нет, может находиться в виде гранул.

Полагают, что гликозидгидролазу, описанную в данном документе, можно применять в комбинации с одним или несколькими дополнительными ферментами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных ферментов, эстераз, формамидазы, –галактозидаз, например α или β–галактозидаз, экзоглюканаз, глюканлиаз, эндоглюканаз, глюкоамилаз, глюкозооксидаз, глюкозидаз, например α– или β–глюкозидаз, глюкуронидаз, гемицеллюлаз, гидролаз, инвертаз, изомераз, лакказ, фенолоксидаз, липазы, лиаз, маннозидаз, оксидаз, оксидоредуктаз, пектиназы, пектатлиаз, пектинацетилэстераз, пектиндеполимераз, пептидазы, пектинметилэстераз, пектинолитических ферментов, пероксидаз, фенолоксидаз, фитазы, полигалактуроназ, рамногалактуроназ, рибонуклеаз, тауматина, трансфераз, транспортных белков, трансглутаминаз, ксиланаз, гексозоксидазы (D–гексозы: (3/4–оксидоредуктаза, EC 1.1.3.5), кислых фосфатаз и/или других или их комбинаций. Они включают ферменты, которые, например, модулируют вязкость композиции или корма.

Любой из ферментов GLCH, рассмотренных в данном документе, предпочтительно альфа–амилазы, глюкоамилазы и альфа–глюкозидазы, можно применять в комбинации с пробиотиками. Категории DFM включают Bacillus, молочнокислые бактерии и дрожжи. Бациллы представляют собой уникальные грамположительные палочки, которые образуют споры. Эти споры очень стабильны и могут выдерживать такие условия окружающей среды, как тепло, влагу и определенный диапазон pH. Эти споры прорастают в активные вегетативные клетки при проглатывании животным и могут быть использованы в тонкоизмельченных и гранулированных рационах. Молочнокислые бактерии представляют собой грамположительные кокки, продуцирующие молочную кислоту, которые являются антагонистами патогенов. Поскольку молочнокислые бактерии, по–видимому, до некоторой степени являются чувствительными к нагреванию, их не используют в гранулированных рационах. Молочнокислые бактерии включают род *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus.* Дрожжи не являются бактериями. Эти микроорганизмы относятся к группе растений, называемой грибы.

Любой из ферментов GLCH, рассмотренных в данном документе, предпочтительно альфа–амилазы, глюкоамилазы и альфа–глюкозидазы, можно применять в комбинации с подходящими лекарственными средствами ветеринарного назначения для снижения степени ацидоза или для снижения численности простейших организмов в рубце.

Такие лекарственные средства ветеринарного назначения могут включать ионофоры, такие как монензин и его производные.

Вещества, связывающие токсины, разработаны для связывания токсинов в корме и защиты животных от их вредных воздействий. Соответственно, любой из ферментов GLCH, рассмотренных в данном документе, можно также применять в комбинации с веществами, связывающими токсины, или адсорбентами токсинов. Примером вещества, связывающего токсины, является вещество, связывающее микотоксины, в том числе

без ограничения различные гидратированные алюмосиликаты натрия и кальция (HSCAS), бентонит, цеолит, глины, клеточные стенки дрожжей и ферменты, расщепляющие токсины.

В другом аспекте любой из ферментов GLCH, рассмотренных в данном документе, можно также применять в комбинации с травами, эссенциальными маслами и средствами против слеживания.

Эссенциальное масло представляет собой концентрированную гидрофобную жидкость, содержащую летучие ароматические соединения из растений. Эссенциальные масла также известны как летучие масла, эфирные масла, эфиромасла или просто как масло растения, из которого они были экстрагированы, такое как гвоздичное масло. "Эссенциальным" масло является в том смысле, что оно содержит "эссенцию" аромата растения – характеристический аромат растения, из которого оно получено. Термин "эссенциальный", используемый в данном документе, не означает незаменимый, как в случае с терминами "эссенциальная аминокислота" или "эссенциальная жирная кислота", которые называются таким образом ввиду того, что их употребление необходимо для конкретного живого организма. Эссенциальные масла, как правило, экстрагируют путем перегонки, часто с применением пара. Другие способы включают выжимание, экстракцию растворителем, экстракцию масла–абсолюта, осмолоподсочку и холодный отжим. Их применяют в парфюмерных продуктах, косметических средствах, мылах и других продуктах, для ароматизации пищи и напитков и для придания ароматов благовониям и бытовым чистящим средствам.

Корма для животных могут включать растительный материал, такой как кукуруза, пшеница, сорго, соя, канола, подсолнечник, или смеси любых из таких растительных материалов, или источники растительного белка для жвачных животных. Предполагается, что будут улучшены показатели производительности животных, такие как рост, потребление корма и эффективность корма, а также улучшена его однородность, снижена концентрация аммиака в помещении для животных и, следовательно, улучшено качество жизни и состояние здоровья животных. Более конкретно, используемое в данном документе выражение "производительность животного" может определяться эффективностью корма, и/или приростом массы тела животного, и/или коэффициентом кормоотдачи, и/или перевариваемостью питательных веществ в корме (например, перевариваемостью аминокислот), и/или усваиваемой энергией или метаболической энергией в корме, и/или удержанием азота, и/или способностью животных избегать неблагоприятных воздействий некротического энтерита, и/или иммунным ответом субъекта.

Термины "корм для животных", "корм", "кормовой продукт" и "фураж" используются взаимозаменяемо и могут включать один или несколько кормовых материалов, выбранных из группы, включающей a) зерновые культуры, такие как мелкозерные (например, пшеницу, ячмень, рожь, овес и их комбинации) и/или крупнозерновые, такие как маис или сорго; b) отходы от переработки зерновых культур, такие как кукурузная глютеновая мука, сушеная барда с растворимыми веществами (DDGS) (в частности сушеная барда с растворимыми веществами на основе кукурузы (cDDGS)), пшеничные отруби, пшеничная крупка, пшеничные мелкие отруби, рисовые отруби, рисовая шелуха, овсяная шелуха, ядро кокосового ореха и цитрусовый жом; c) белок, полученный из источников, таких как соя, подсолнечник, арахис, люпин, виды гороха, конские бобы, хлопчатник, канола, рыбная мука, сухой белок плазмы крови, мясо–костная мука, картофельный белок, сыворотка, копра, кунжут; d) масла и жиры, полученные из растительных и животных источников и/или e) минералы и витамины.

В случае применения в качестве корма, такого как функциональный корм, или при его получении, композицию на основе фермента или композицию кормовой добавки по настоящему изобретению можно применять в сочетании с одним или несколькими из приемлемого в пищевом отношении носителя, приемлемого в пищевом отношении разбавителя, приемлемого в пищевом отношении наполнителя, приемлемого в пищевом отношении вспомогательного вещества, активного в пищевом отношении ингредиента. Например, можно упомянуть по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из белка, пептида, сахарозы, лактозы, сорбита, глицерина, пропиленгликоля, хлорида натрия, сульфата натрия, ацетата натрия, цитрата натрия, формиата натрия, сорбата натрия, хлорида калия, сульфата калия, ацетата калия, цитрата калия, формиата калия, ацетата калия, сорбата калия, хлорида магния, сульфата магния, ацетата магния, цитрата магния, формиата магния, сорбата магния, метабисульфита натрия, метилпарабена и пропилпарабена.

В предпочтительном варианте осуществления к композиции на основе фермента или к композиции кормовой добавки по настоящему изобретению примешивают кормовой компонент с образованием кормового продукта. Используемый в данном документе термин "кормовой компонент" означает весь кормовой продукт или его часть. Часть кормового продукта может означать один составляющий компонент кормового продукта или более чем один составляющий компонент кормового продукта, например 2, или 3, или 4, или более. В одном варианте осуществления термин "кормовой компонент" охватывает премикс или составляющие компоненты премикса. Предпочтительно корм может представлять собой фураж или его премикс, комбикорм или его премикс.

К композиции кормовой добавки в соответствии с настоящим изобретением может быть примешан комбикорм, компонент комбикорма или премикс комбикорма или фураж, компонент фуража или премикс фуража.

Любой кормовой продукт, описанный в данном документе, может включать один или несколько кормовых материалов, выбранных из группы, включающей a) злаки, такие как мелкозерные (например, пшеницу, ячмень, рожь, овес, тритикале и их комбинации) и/или крупнозерновые, такие как маис или сорго; b) отходы от переработки зерновых, такие как кукурузная глютеновая мука, влажная барда (в частности кукурузная влажная барда), сушеная барда (DDG) (в частности кукурузная сушеная барда (cDDG)), сушеная барда с растворимыми веществами (DDGS) (в частности кукурузная сушеная барда с растворимыми веществами (cDDGS)), пшеничные отруби, пшеничная крупка, пшеничные мелкие отруби, рисовые отруби, рисовая шелуха, овсяная шелуха, ядро кокосового ореха и цитрусовый жом; c) белок, полученный из таких источников, как соя, подсолнечник, арахис, люпин, виды гороха, конские бобы, хлопчатник, канола, рыбная мука, сухой белок плазмы, мясо–костная мука, картофельный белок, сыворотка, копра, кунжут; d) масла и жиры, полученные из растительных и животных источников; e) минералы и витамины.

Термин "фураж", используемый в данном документе, означает любую пищу, которую дают животному (в отличие от пищи, которую животное добывает самостоятельно). Фураж охватывает растения, которые были срезаны. Более того, фураж включает силос, прессованные и гранулированные корма, масла и смешанные рационы, а также проросшие зерновые и бобовые.

Фураж может быть получен из одного или нескольких растений, выбранных из: кукурузы (маиса), люцерны (люцерны посевной), ячменя, ледвенца рогатого, представителей рода капусты, капусты огородной сорта Chau moellier, кормовой

капусты, семени рапса (канолы), репы (брюквы), турнепса, клевера, гибридного клевера, красного клевера, подземного клевера, белого клевера, овсяницы, костра, проса, овса, сорго, соевых бобов, деревьев (побегов подстриженных деревьев для древесного сена), пшеницы и бобовых.

Термин "комбикорм" означает промышленный корм в форме муки, гранулы, орешков, жмыха или крошки. Комбикорма можно смешивать с различным сырьем и добавками. Эти смеси составляют в соответствии с конкретными требованиями для целевого животного.

Комбикорма могут быть полными кормами, которые обеспечивают все суточно необходимые питательные вещества, концентратами, которые обеспечивают часть рациона (белковую, энергетическую), или добавками, которые обеспечивают только дополнительные питательные микроэлементы, такие как минералы и витамины

Основными ингредиентами, применяемыми в комбикорме, являются кормовые зерновые, которые включают кукурузу, пшеницу, каноловый шрот, рапсовый шрот, люпин, соевые бобы, сорго, овес и ячмень.

Соответственно, премиксом, как обозначается в данном документе, может быть композиция, состоящая из микроингредиентов, таких как витамины, минералы, химические консерванты, антибиотики, продукты ферментации и другие необходимые ингредиенты. Премиксами обычно являются композиции, подходящие для смешивания в промышленных рационах.

В одном варианте осуществления кормовой продукт содержит кукурузу, DDGS (такую как cDDGS), пшеницу, пшеничные отруби или любую их комбинацию, или состоит из них.

В одном варианте осуществления кормовой компонент может представлять собой кукурузу, DDGS (например, cDDGS), пшеницу, пшеничные отруби или их комбинацию. В одном варианте осуществления кормовой продукт содержит кукурузу, DDGS (такую как cDDGS) или их комбинацию, или состоит из них.

Кормовой продукт, описанный в данном документе, может содержать по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% по весу кукурузной и соевой муки или кукурузы и необезжиренной сои, или пшеничной муки, или кормовой муки из жмыха семян подсолнечника.

Например, кормовой продукт может содержать от приблизительно 5 до приблизительно 40% кукурузной DDGS. Для домашней птицы кормовой продукт может содержать в среднем от приблизительно 7 до приблизительно 15% кукурузной DDGS. Для домашних свиней (свиней) кормовой продукт может содержать в среднем 5–40% кукурузной DDGS. Он также может содержать кукурузу в виде цельного зерна, и в этом случае кормовой продукт может содержать от приблизительно 35% до приблизительно 80% кукурузы.

В кормовых продуктах, содержащих зерновую смесь, например, содержащих кукурузу и пшеницу, например, кормовой продукт может содержать по меньшей мере 10% кукурузы.

Дополнительно или в качестве альтернативы кормовой продукт также может содержать по меньшей мере один кормовой материал с высоким содержанием клетчатки и/или по меньшей мере один продукт переработки по меньшей мере одного кормового материала с высоким содержанием клетчатки для получения кормового продукта с высоким содержанием клетчатки. Примеры кормовых материалов с высоким содержанием клетчатки включают пшеницу, ячмень, рожь, овес, отходы от переработки зерновых, такие как кукурузная глютеновая мука, кукурузный глютеновый кормовой

продукт, влажная барда, сушеная барда (DDG), сушеная барда с растворимыми веществами (DDGS), пшеничные отруби, пшеничная крупка, пшеничные мелкие отруби, рисовые отруби, рисовая шелуха, овсяная шелуха, ядро кокосового ореха и цитрусовый жом. Некоторые источники белка также можно рассматривать как источники с высоким содержанием клетчатки: белок, полученный из таких источников, как подсолнечник, люпин, конские бобы и хлопчатник. В одном аспекте кормовой продукт, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере один материал с высоким содержанием клетчатки и/или по меньшей мере один продукт переработки по меньшей мере одного кормового материала с высоким содержанием клетчатки, выбранный из группы, состоящей, например, из сушеной барды с растворимыми веществами (DDGS), в частности cDDGS, влажной барды, сушеной барды (DDG), в частности cDDG, пшеничных отрубей и пшеницы. В одном варианте осуществления изобретения кормовой продукт по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один материал с высоким содержанием клетчатки и/или по меньшей мере один продукт переработки по меньшей мере одного кормового материала с высоким содержанием клетчатки, выбранный из группы, состоящей, например, из сушеной барды с растворимыми веществами (DDGS), в частности cDDGS, пшеничных отрубей и пшеницы.

Корм может представлять собой один или несколько из следующего: комбикорм и премикс, в том числе гранулы, орешки или жмых (для крупного рогатого скота); сельскохозяйственная культура или остатки сельскохозяйственных культур: кукуруза, соевые бобы, сорго, овес, ячмень, копра, солома, мякина, отходы сахарной свеклы; рыбная мука; мясо–костная мука; меласса; масличный жмых и прессованный жмых; олигосахариды; консервированные кормовые растения: силос; водоросли; семена и зерна, цельные или подготовленные дроблением, измельчением и т. д.; проросшие зерновые и бобовые; экстракт дрожжей.

Используемый в данном документе термин "корм" охватывает в некоторых вариантах осуществления корм для домашних животных. Корм для домашних животных представляет собой материал растительного или животного происхождения, предназначенный для потребления домашними животными, такой как корм для собак или корм для кошек. Корм для домашних животных, такой как корм для собак и кошек, может быть либо в сухой форме, такой как гранулированный корм для собак, либо во влажной консервированной форме. Корм для кошек может содержать аминокислоту таурин.

Корм для животных может также включать корм для рыб. Корм для рыб в норме содержит питательные макроэлементы, микроэлементы и витамины, необходимые для поддержания здоровья рыб, содержащихся в неволе. Корм для рыб может быть в форме хлопьевидной частицы, гранулы или таблетки. Гранулированные формы, некоторые из которых быстро тонут в воде, часто используют для более крупных видов рыбы или видов, питающихся на дне. Некоторые корма для рыб также содержат добавки, такие как бета–каротин или половые гормоны для искусственного усиления окраски и узора рыб.

В еще одном аспекте корм для животных охватывает корм для птиц. Корм для птиц включает пищу, которую используют как в кормушках для птиц, так и для кормления комнатных птиц. Обычно корм для птиц содержит разные семена, но также может включать нутряное сало (говяжий или бараний жир).

Используемый в данном документе термин "приведенный в контакт" относится к опосредованному или непосредственному применению гликозидгидролазы, описанной в данном документе

(или к композиции, содержащей гликозидгидролазу), в отношении продукта (например, корма). Примеры способов применения, которые можно использовать, включают без ограничения обработку продукта в материале, содержащем композицию кормовой добавки, непосредственное применение путем смешивания композиции кормовой добавки с продуктом, нанесение распылением композиции кормовой добавки на поверхность продукта или погружение продукта в препарат на основе композиции кормовой добавки. В одном варианте осуществления композицию кормовой добавки по настоящему изобретению предпочтительно примешивают к продукту (например, кормовому продукту). В качестве альтернативы композицию кормовой добавки можно включать в эмульсию или сырьевые ингредиенты кормового продукта. Это позволяет улучшить характеристики композиции.

Термин "термически стабильный" означает, что по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% или 98% фермента, который присутствовал/был активен в добавке перед нагреванием до указанной температуры, все еще присутствует/активен после охлаждения до комнатной температуры. Предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80% фермента, присутствующего и активного в добавке перед нагреванием до указанной температуры, все еще присутствует и активен после охлаждения до комнатной температуры.

Также возможно, что гликозидгидролазы (или композиция на основе ферментов, содержащая такие гликозидгидролазы, описанные в данном документе), описанные в данном документе, можно гомогенизировать с получением порошка.

В альтернативном предпочтительном варианте осуществления гликозидгидролазу, описанную в данном документе (или композицию на основе ферментов, содержащую гликозидгидролазу, описанную в данном документе), можно составить в виде гранул, как описано в WO 2007/044968 (называемых гранулами TPT), или WO 1997/016076, или WO 1992/012645, включенных в данный документ посредством ссылки. "TPT" означает технологию термозащиты.

В другом аспекте, когда композицию кормовой добавки составляют в виде гранул, эти гранулы содержат гидратированную соль, являющуюся барьером, которая покрывает белковое ядро. Преимуществом такого солевого покрытия является улучшенная термоустойчивость, улучшенная стабильность при хранении и защита от других кормовых добавок, неблагоприятно воздействующих каким–либо образом на фермент. Предпочтительно соль, используемая для солевого покрытия, характеризуется активностью воды более 0,25 или постоянной влажностью более 60% при 20°C. В некоторых вариантах осуществления солевое покрытие содержит Na_2SO_4.

Способ получения гликозидгидролазы, описанной в данном документе (или композиции на основе ферментов, содержащей гликозидгидролазу, описанную в данном документе), может также включать дополнительную стадию гранулирования порошка. Порошок можно смешивать с другими компонентами, известными из уровня техники. Порошок или смесь, содержащую порошок, можно продавить через форму и полученные нити разрезать на подходящие гранулы различной длины.

Необязательно стадия гранулирования может включать обработку паром или стадию кондиционирования перед образованием гранул. Смесь, содержащую порошок, можно поместить в кондиционирующее устройство, например, смеситель со впрыском пара. Смесь нагревают в кондиционирующем устройстве до заданной температуры, например, 60–100ºC, типичные температуры будут составлять 70ºC, 80ºC, 85ºC, 90ºC или 95ºC. Время пребывания может варьироваться от секунд до минут и даже часов. Например, 5 секунд, 10 секунд, 15 секунд, 30 секунд, 1 минута, 2 минуты, 5 минут, 10 минут, 15

минут, 30 минут и 1 час. Будет понятно, что гликозидгидролаза, описанная в данном документе (или композиция на основе ферментов, содержащая гликозидгидролазу, описанную в данном документе), подходит для добавления в любой подходящий кормовой материал.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что разные животные нуждаются в разных кормовых продуктах, и даже одному и тому же животному могут требоваться различные кормовые продукты в зависимости от цели, ради которой выращивают животное.

Необязательно кормовой продукт может также содержать дополнительные минералы, такие как, например, кальций и/или дополнительные витамины. В некоторых вариантах осуществления кормовой продукт представляет собой смесь кукурузной и соевой муки.

Кормовой продукт обычно получают в кормодробилках, в которых сырье сначала измельчают до подходящего размера частиц, а затем смешивают с соответствующими добавками. Затем кормовой продукт можно получить в виде кашицы или гранул; последние, как правило, предполагают способ, с помощью которого температуру поднимают до заданного уровня, а затем корм пропускают через форму с получением гранул конкретного размера. Гранулам дают остыть. Впоследствии можно добавлять жидкие добавки, такие как жир и фермент. Получение кормового продукта также может включать дополнительную стадию, которая до гранулирования включает экструзию или разбухание, в частности с помощью подходящих методик, которые могут включать по меньшей мере применение пара.

Кормовой продукт может представлять собой кормовой продукт для животных с однокамерным желудком, таких как домашняя птица (например, бройлер, несушка, несушки бройлерного типа, индейка, утка, гуси, водоплавающая птица) и домашняя свинья (все возрастные категории), жвачных животных, таких как крупный рогатый скот (например, коров или быков (в том числе телят)), лошадей, овец, домашних животных (например, собак, кошек) или рыбы (например, рыбы без желудка, рыбы с желудком, пресноводной рыбы, такой как лосось, треска, форель и карп, например карп кои, морской рыбы, такой как морской окунь, и ракообразных, таких как мелкие креветки, мидии и гребешки). Предпочтительно кормовой продукт предназначен для свиней.

Композицию кормовой добавки и/или кормовой продукт, содержащий ее, можно применять в любой подходящей форме. Композицию кормовой добавки можно применять в форме твердых или жидких препаратов или их альтернативных вариантов. Примеры твердых препаратов включают порошки, пасты, болюсы, капсулы, драже, таблетки, присыпки и гранулы, которые могут быть смачиваемыми, высушенными распылительной сушкой или лиофилизированными. Примеры жидких препаратов включают без ограничения водные, органические или водно–органические растворы, суспензии и эмульсии.

В некоторых применениях композиции кормовой добавки можно смешивать с кормом или вводить в питьевую воду.

Композиция кормовой добавки, предусматривающая примешивание гликозидгидролазы, как изложено в данном документе, с приемлемым для корма носителем, разбавителем или наполнителем и (необязательно) упаковку.

Кормовой продукт и/или композицию кормовой добавки можно комбинировать с по меньшей мере одним минералом и/или по меньшей мере одним витамином. Полученные таким образом композиции могут упоминаться в данном документе как премикс. Кормовой продукт может содержать по меньшей мере 0,0001% по весу

кормовой добавки. Соответственно, кормовой продукт может содержать по меньшей мере 0,0005%; по меньшей мере 0,0010%; по меньшей мере 0,0020%; по меньшей мере 0,0025%; по меньшей мере 0,0050%; по меньшей мере 0,0100%; по меньшей мере 0,020%; по меньшей мере 0,100%, по меньшей мере 0,200%; по меньшей мере 0,250%; по меньшей мере 0,500% по весу кормовой добавки.

Предпочтительно композиция пищевой или кормовой добавки может дополнительно содержать по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель. Физиологически приемлемый носитель предпочтительно выбран из по меньшей мере одного из мальтодекстрина, известняка (карбоната кальция), циклодекстрина, пшеницы или компонента пшеницы, сахарозы, крахмала, Na_2SO_4, талька, PVA и их смесей. В дополнительном варианте осуществления пищевая или кормовая добавка может дополнительно содержать хелатор ионов металлов. Хелатор ионов металлов может быть выбран из EDTA или лимонной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления композиция пищевой или кормовой добавки содержит гликозидгидролазу, описанную в данном документе, на уровне по меньшей мере 0,0001 г/кг, 0,001 г/кг, по меньшей мере 0,01 г/кг, по меньшей мере 0,1 г/кг, по меньшей мере 1 г/кг, по меньшей мере 5 г/кг, по меньшей мере 7,5 г/кг, по меньшей мере 10,0 г/кг, по меньшей мере 15,0 г/кг, по меньшей мере 20,0 г/кг, по меньшей мере 25,0 г/кг. В некоторых вариантах осуществления пищевая или кормовая добавка содержит на таком уровне, что при добавлении к пищевому или кормовому материалу этот кормовой материал содержит гликозидгидролазу, описанную в данном документе, в диапазоне 1–500 мг/кг, 1–100 мг/кг, 2–50 мг/кг или 2–10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пищевой или кормовой материал содержит по меньшей мере 100, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000, 20000, 30000, 50000, 100000, 500000, 1000000 или 2000000 единиц гликозидгидролазы на килограмм кормового или пищевого материала.

Диапазоны могут включать без ограничения любую комбинацию нижних и верхних пределов диапазонов, рассмотренных выше.

Составы, содержащие любую из гликозидгидролаз, описанных в данном документе, и композиции, описанные в данном документе, можно получить любым подходящим способом с гарантией того, что состав будет содержать активные ферменты. Такие составы могут представлять собой жидкость, сухой порошок или гранулу. Предпочтительно композиция кормовой добавки находится в твердой форме, подходящей для добавления на кормовую гранулу или в нее.

Сухой порошок или гранулы можно получить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, таких как гранулирование с высоким сдвиговым усилием, барабанное гранулирование, экструзия, сферонизация, агломерация с псевдоожиженным слоем, сушка распылением с псевдоожиженным слоем.

Гликозидгидролазы и композиции, описанные в данном документе, могут иметь покрытие, например быть инкапсулированными. В одном варианте осуществления покрытие защищает ферменты от воздействия тепла и может считаться термозащитным средством. В одном варианте осуществления покрытие защищает фермент от воздействия низкого pH. Eudragit® является одним примером материала для покрытия, который можно применять.

Композиция кормовой добавки, описанная в данном документе, может быть составлена в виде сухого порошка или гранул, как описано в WO2007/044968 (называемых гранулами TPT) или WO1997/016076 или WO1992/012645 (каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки).

В одном варианте осуществления корм для животных может быть составлен в виде гранул для кормовых композиций, содержащих: ядро; активное средство и по меньшей мере одно покрытие, при этом активное средство гранулы сохраняет по меньшей мере 50% активность, по меньшей мере 60% активность, по меньшей мере 70% активность, по меньшей мере 80% активность после воздействия условий, выбранных из одного или нескольких из: a) способа гранулирования корма, b) способа предварительной обработки корма с паровым нагревом, c) хранения, d) хранения в виде ингредиента в негранулированной смеси и e) хранения в виде ингредиента в исходной кормовой смеси или кормовом премиксе, содержащем по меньшей мере одно соединение, выбранное из микроэлементов, органических кислот, восстанавливающих сахаров, витаминов, хлорида холина и соединений, которые обеспечивают кислотность или основность исходной кормовой смеси или кормовому премиксу.

Что касается гранулы, то по меньшей мере одно покрытие может содержать увлажняющий гидратирующий материал, который составляет по меньшей мере 55% вес/вес гранулы и/или по меньшей мере одно покрытие может содержать два покрытия. Эти два покрытия могут представлять собой увлажняющее гидратирующее покрытие и влагоудерживающее покрытие. В некоторых вариантах осуществления увлажняющее гидратирующее покрытие может составлять от 25% до 60% вес/вес гранулы, а влагоудерживающее покрытие может составлять от 2% до 15% вес/вес гранулы. Увлажняющее гидратирующее покрытие может быть выбрано из неорганических солей, сахарозы, крахмала и мальтодекстрина, а влагоудерживающее покрытие может быть выбрано из полимеров, смол, молочной сыворотки и крахмала.

Гранула может быть получена с помощью способа гранулирования корма, и способ предварительной обработки корма может проводиться при 70°C–95°C в течение нескольких минут, например, при 85°C – 95°C.

Композиция кормовой добавки может быть составлена в виде гранул для корма для животных, содержащих: ядро; активное средство, при этом активное средство гранулы сохраняет по меньшей мере 80% активность после хранения и после осуществления способа гранулирования с паровым нагревом, где гранула представляет собой ингредиент; влагоудерживающее покрытие и увлажняющее гидратирующее покрытие, которое составляет по меньшей мере 25% вес/вес гранулы, при этом гранула характеризуется активностью воды менее 0,5 до осуществления способа гранулирования с паровым нагревом.

Гранула может иметь влагоудерживающее покрытие, выбранное из полимеров и смол, а увлажняющий гидратирующий материал может представлять собой неорганическую соль. Увлажняющее гидратирующее покрытие может составлять от 25% до 45% вес/вес гранулы, а влагоудерживающее покрытие может составлять от 2% до 10% вес/вес гранулы.

Гранула может быть получена с помощью способа гранулирования с паровым нагревом, который может проводиться при 85°C–95°C в течение нескольких минут.

В качестве альтернативы, композиция находится в виде жидкого состава, подходящего для потребления, предпочтительно, такая потребляемая жидкость содержит одно или несколько из следующего: буфер, соль, сорбит и/или глицерин.

Кроме того, композиция кормовой добавки может быть составлена путем нанесения, например распыления, фермента(ферментов) на подложку–носитель, такую как, например, молотая пшеница.

В одном варианте осуществления композиция кормовой добавки может быть составлена в виде премикса. Только в качестве примера премикс может содержать один

или несколько кормовых компонентов, таких как один или несколько минералов и/или один или несколько витаминов.

В некоторых вариантах осуществления гликозидгидролаза будет находиться в физиологически приемлемом носителе. Подходящими носителями могут быть крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты. Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Дополнительно, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства или регулирующие pH буферные вещества. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема пациентом внутрь. После составления композиции по настоящему изобретению можно вводить непосредственно жвачному животному.

Неограничивающие примеры композиций и способов, раскрытых в данном документе, включают следующие.

1. Способ увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы у жвачного животного, который включает добавление по меньшей мере одной альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы (GLCH) в качестве кормовой добавки в корм для жвачного животного, где указанная гидролаза (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью гидролазы при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанная гидролаза активна в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) гидролаза действует совместно с пищеварительными ферментами, присутствующими в пищеварительных камерах жвачного животного, с обеспечением увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы.

2. Гидролаза согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в рубце или сычуге.

3. Гидролаза согласно варианту осуществления 1, где указанная гидролаза выбрана из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и альфа–глюкозидаз.

4. Гидролаза согласно варианту осуществления 2, где указанная гидролаза выбрана из группы, состоящей из альфа–амилаз и глюкоамилаз.

5. Гидролаза согласно варианту осуществления 3 или 4, где альфа–амилазы являются членами семейства GH 13 или выбраны из группы, состоящей из альфа–амилазы (EC 3.2.1.1); пуллуланазы (EC 3.2.1.41); цикломальтодекстрин–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.19); цикломальтодекстриназы (EC 3.2.1.54); трегалозо–6–фосфатгидролазы (EC 3.2.1.93); олиго–альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.10); мальтогенной амилазы (EC 3.2.1.133); неопуллуланазы (EC 3.2.1.135); альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); мальтотетраозо–образующей альфа–амилазы (EC3.2.1.60); изоамилазы (EC 3.2.1.68); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); мальтогексаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.98); мальтотриозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.116); ветвящего фермента (EC 2.4.1.18); трегалозосинтазы (EC 5.4.99.16); 4–альфа–глюканотрансферазы (EC

2.4.1.25); мальтопентаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.–) ; амилосахаразы (EC 2.4.1.4); сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7); мальтоолигозилтрегалозы–трегалогид ролазы (EC 3.2.1.141); изомальтулозосинтазы (EC 5.4.99.11); мальтоолигозилтрегалозосинтазы (EC 5.4.99.15); амило–альфа–1,6–глюкозидазы (EC 3.2.1.33) и альфа–1,4–глюкан:фосфат–альфа–мальтозилтрансферазы (EC 2.4.99.16).

6. Гидролаза согласно варианту осуществления 3 или 4, где глюкозидазы являются членами семейства GH 13 или GH31 или выбраны из группы, состоящей из альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); альфа–галактозидазы (EC 3.2.1.22); альфа–маннозидазы (EC 3.2.1.24); альфа–1,3–глюкозидазы (EC 3.2.1.84); сахаразы–изомальтазы (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); альфа–ксилозидазы (EC 3.2.1.177); альфа–глюканлиазы (EC 4.2.2.13); изомальтозилтрансферазы (EC 2.4.1.–); олигосахар ид–альфа–1,4–глюкозилтрансферазы (EC 2.4.1.161); сульфохиновозидазы (EC 3.2.1.–).

7. Гидролаза согласно варианту осуществления 3 или 4, где глюкоамилазы являются членами семейства GH15 или выбраны из группы, состоящей из глюкоамилазы (EC 3.2.1.3); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); альфа–трегалазы (EC 3.2.1.28) и декстрандекстриназы (EC 2.4.1.2).

8. Способ увеличения перевариваемости крахмала, увеличения выхода глюкозы, увеличения переваривания сухого вещества и увеличения газообразования во время ферментации у жвачного животного, включающий добавление в корм композиции на основе ферментов, содержащей (i) по меньшей мере один фермент GLCH в качестве кормовой добавки для жвачного животного, где указанный фермент (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанный фермент активен в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) фермент действует совместно с панкреатической амилазой с обеспечением увеличения выхода глюкозы, и (ii) по меньшей мере одну протеазу.

9. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 8, где по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала.

10. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 8, где указанный фермент GLCH выбран из группы, состоящей из альфа–амилаз, глюкоамилаз и альфа–глюкозидаз.

11. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 9, где указанный фермент выбран из группы, состоящей из альфа–амилаз и глюкоамилаз.

12. Композиция на основе ферментов согласно вариантам осуществления 10 и 11, где по меньшей мере один фермент GLCH выбран из группы, состоящей из альфа–амилазы (EC 3.2.1.1); пуллуланазы (EC 3.2.1.41); цикломальтодекстрин–глюкан отрансферазы (EC 2.4.1.19); цикломальтодекстриназы (EC 3.2.1.54); трегалозо–6–фосфатгидролазы (EC 3.2.1.93); олиго–альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.10); мальтогенной амилазы (EC 3.2.1.133); неопуллуланазы (EC 3.2.1.135); альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); мальтотетраозо–образующей альфа–амилазы (EC3.2.1.60); изоамилазы (EC 3.2.1.68); глюкодекстраназы (EC 3.2.1.70); мальтогексаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.98); мальтотриозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.116); ветвящего фермента (EC 2.4.1.18); трегалозосинтазы (EC 5.4.99.16); 4–альфа–глюканотрансферазы (EC 2.4.1.25); мальтопентаозо–образующей альфа–амилазы (EC 3.2.1.–); амилосахаразы (EC 2.4.1.4) ; сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7); мальтоолигозилтрегалозы–трегалогидролазы (EC 3.2.1.141); изомальтулозосинтазы (EC 5.4.99.11); мальтоолигозилтрегалозосинтазы (EC 5.4.99.15);

амило–альфа–1,6–глюкозидазы (EC 3.2.1.33) и альфа–1,4–глюкан:фосфат–альфа–мальтозилтрансферазы (EC 2.4.99.16).

13. Композиция на основе ферментов по п. 10 или п. 11, где глюкозидазы выбраны из группы, состоящей из альфа–глюкозидазы (EC 3.2.1.20); альфа–галактозидазы (EC 3.2.1.22); альфа–маннозидазы (EC 3.2.1.24); альфа–1,3–глюкозидазы (EC 3.2.1.84); сахаразы–изомальтазы (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); альфа–ксилозидазы (EC 3.2.1.177); альфа–глюканлиазы (EC 4.2.2.13); изомальтозилтрансферазы (EC 2.4.1.–); олигосахарид–альфа–1,4–глюкозилтрансферазы (EC 2.4.1.161); сульфохиновозидазы (EC 3.2.1.–).

14. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 10 или 11, где глюкоамилазы выбраны из семейства гликозилгидролаз GH15.

15. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 8, где протеаза выбрана из группы, состоящей из кислой протеазы или нейтральной металлопротеазы.

16. Композиция на основе ферментов согласно варианту осуществления 15, где протеаза представляет собой грибную аспарагиновую протеазу или бактериальную нейтральную металлопротеазу.

ПРИМЕРЫ

Если в данном документе не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же самое значение, которое обычно понимает специалист в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2D ED., John Wiley and Sons, New York (1994) и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) предоставляют для специалиста общий словарь для многих терминов, используемых в данном раскрытии.

Настоящее изобретение дополнительно определено в следующих примерах. Следует понимать, что примеры, хотя и показывают определенные варианты осуществления, приводятся исключительно в целях иллюстрации. Из приведенного выше обсуждения и примеров специалист в данной области техники сможет установить существенные характеристики настоящего изобретения, и не отклоняясь от его идеи и объема, сможет осуществить различные изменения и модификации для его адаптации к различным областям применения и условиям.

ПРИМЕР 1

Материалы, применяемые в последующих примерах

Образцы белка, перечисленные в таблице 1, применяли в последующих примерах. В таблице 1 продемонстрированы тип фермента, организм–источник (если известен), и внутренний или коммерческий источник образцов, и ссылки на патенты для последовательностей.

Таблица 1 . Список оцененных ферментных компонентов

Название белка	Тип фермента	Организм-источник	Ссылка
AkAA	альфа-амилаза	*Рекомбинантный, источник Aspergillus kawachii*	Патент US 7354752
AcAA	альфа-амилаза	Рекомбинантный, источник *Aspergillus clavatus*	Патент US 8945889
AtAA	альфа-амилаза	Рекомбинантный, источник *Aspergillus terreus*	Патент US 20150376668
TrGA	глюкоамилаза	Рекомбинантный, источник *T. reesei*	Патент US 7413879
CS4	глюкоамилаза	Рекомбинантный, вариант	Патент US 8058033
Brew1	глюкоамилаза	Рекомбинантный, вариант	Патент US 8809023
FvGA	глюкоамилаза	Рекомбинантный, источник *Fusarium verticillioides*	Патент WO 2016100871
AfuGA	глюкоамилаза	Рекомбинантный, источник *Aspergillus fumigatus*	Патент US 20160115509
AFP	протеаза	Рекомбинантный, источник *T. reesei*	Патент US 8288517
Дрожжевая мальтаза	альфа-глюкозидаза	Megazyme	№ в каталоге E-MALTS
TG L-2000	альфа-глюкозидаза	Рекомбинантный, источник *Aspergillus niger*	US 2015/0240279

Aclglu1	альфа-глюкозидаза	Рекомбинантный, источник *A. clavatus*	US 20150240279
Nfiglu1	альфа-глюкозидаза	Рекомбинантный, источник *Neosartorya fischeri*	US 20150240279
TauSec098	альфа-глюкозидаза	*Rasamsonia composticola*	US 20150240279
TauSec099	альфа-глюкозидаза	*Rasamsonia composticola*	US 20150240279
Свиной пепсин	протеаза	Sigma	№ в каталоге P7000
Свиной панкреатин	Множество ферментов	Sigma	№ в каталоге P7545
P14L	нейтральная металлоэндопептидаза (термолизин)	*Geobacillus caldoproteolyticus*	Патент US 8114656
P7L	нейтральная металлоэндопептидаза (бациллолизин)	*Bacillus amyloliquefaciens*	Патент US 8574884
AnGA	глюкоамилаза	*Aspergillus niger*, Megazyme	№ в каталоге E-AMGDF

ПРИМЕР 2

Гидролиз кукурузной муки посредством амилазы AkAA в присутствии кислой аспарагиновой протеазы свиного пепсина и AFP *Trichoderma reesei*

Реакционная смесь содержала 1 мл взвеси кукурузной муки (20%, вес/вес, pH 3,2), 20 мкл AkAA (209 мг/мл), 50 мкл свиного пепсина (Sigma, P7000, 10000 ед./мл в воде), 5 мкл AFP из *Trichoderma reesei* (5 мг/мл) и 50 мкл и воду до конечного объема 1,07 мл. Реакцию проводили при 40°C в течение 5 ч. со встряхиванием при 200 об/мин. В конце реакции 30 мкл надосадочной жидкости реакционной смеси смешивали с 0,23 мл воды и фильтровали через 0,22 мкм мембранный фильтр. Фильтрат (40 мкл) подвергали анализу HPLC с применением колонки для HPLC Aminex HPX–87N (Bio–Rad) при расходе 0,6 мл/мин при 78°C на протяжении 15 мин с применением воды в качестве элюента. Пики глюкозы и мальтозы определяли с применением встроенного детектора RI (коэффициента преломления), и площади пиков интегрировали с применением программного обеспечения Chromeleon (Dionex) в соответствии с инструкциями производителя.

Пепсин не должен оказывать влияние на активность кормовых ферментов для жвачных животных, если они должны функционировать в сычуге и тонкой кишке.

На фигуре 1 показано, что ни пепсин, ни AFP не оказывали отрицательного влияния на высвобождение глюкозы (G1) и мальтозы (G2) из кукурузной муки при значении pH 3,2. pH 3,2 является одним из значений pH, которые могут возникать в сычуге, особенно после приема корма (Constable et al., 2005. Effect of suckling cow's milk or milk replacer on abomasal luminal pH in dairy calves, J. Vet. Intern. Med. 19:97–102). Фактически, добавление пепсина и AFP в реакционную смесь, содержащую AkAA, увеличивало высвобождение G1 на 4 и 22% соответственно. Пепсин сам по себе вызывал незначительное или нулевое высвобождение G1 и G2 из кукурузной муки, при этом AFP сама по себе вызывала в

некоторой степени высвобождение G1, но не G2. AFP, добавленная в реакционную смесь, содержащую AkAA, не только приводила к увеличению высвобождения G1, но также увеличивала количество G1 по сравнению с G2, что указывает на то, что AFP в большей степени способствует высвобождение глюкозы, мономера (G1). Именно G1 может быть непосредственно абсорбирована животными в кровоток.

Полагают, что в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в желудке жвачного животного и сычуге, две аспарагиновые протеазы, вероятно, сделали гранулы кукурузного крахмала более доступными для AkAA путем гидролиза белков, окружающих гранулы, и белков, обнаруженных внутри гранулы (Mu–Forster et al., 1996. Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm granule–associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II, Plant Physiol. 111: 821–829; Mu–Forster et al., 1998. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm, proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross–linking of granule–associated polypeptides. Plant Physiol. 116: 1563–1571). Пепсин является важнейшим протеолитическим фермент, вырабатываемым в желудке и сычуге. Он осуществляет переваривание белков посредством расщепления внутренних пептидных связей с оптимальным значением pH, составляющим 2–4. AFP является внеклеточной эндопептидазой из *T. reesei* с оптимальным значением pH в диапазоне 3–4,5 (таблица 1).

Кукуруза, применяемая в примере 2 и других примерах, если не указано иное, состояла из 88,2% сухого вещества (DM), 9,3% неочищенного белка (CP), 2,0% кислотно–детергентного волокна (ADF), 6,6% нейтрально–детергентного волокна, обработанного амилазой (aNDF), 78,5% неволокнистых углеводов (NFC), 89,0% общего количества перевариваемых питательных веществ (TDN).

ПРИМЕР 3

Стабильность амилазы AkAA в присутствии рубцового сока

Для того, чтобы ферментная добавка в корм для животных обладала эффективностью у жвачных животных важно, чтобы фермент характеризовался значительной стабильность в рубцовом соке и в характерных для рубца условиях. Данные в таблице 2 показывают, что AkAA стабильна в присутствии бесклеточного рубцового сока при инкубировании при 40°C в течение 4,5 ч., так как высвобождение глюкозы и мальтозы не было в значительной степени затронуто увеличением количеств рубцового сока.

Использованная AkAA характеризовалась концентрацией общего белка, составляющей 209 мг/мл, гранулы рисового крахмала (Sigma S7260) получали в воде в виде 8% (вес/вес) взвеси со значением pH, отрегулированном до 3,2. Значение pH становилось равным pH 5,3 после смешивания со смесью для предварительной инкубации. Бесклеточный рубцовый сок, характеризующийся значением pH, составляющим 6,1, отбирали из молочной коровы, питающейся смешанным рационом на основе травы (41,66%), цельнозернового ячменя (14,79%), маиса (16,78%), обезвоженного жома сахарной свеклы и жмыха остатков сахарной свеклы (3,02%), молотого ячменя (6,66%), муки из семян рапса (4,88%), соевой муки (4,46%), Komix (смесь витаминов и минералов, 0,2%), Roed Suplex Caps (смесь витаминов 0,05%), Suplex E–5000 (витамин E и селен, 0,03%), мела (0,07%), соли (0,06%) и воды (7,33%). Рубцовый сок был предоставлен кафедрой зоотехники Орхусского университета (аллея Бличерс 20, DK–8830 Тьеле, Дания). Высвобожденный в ходе реакции сахар анализировали посредством HPLC с применением колонки для HPLC Aminex HPX–87N от Bio–Rad, как описано в примере 2.

Таблица 2. Стабильность AkAA в рубцовом соке при 40°C в течение 4,5 ч.

Обработка № (n=3)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Рубцовый сок, мкл	0	0	90	90	140	140	190	190	240	240
AkAA, мкл	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Рубцовый сок, подвергнутый термической обработке, мкл	240	240	150	150	100	100	50	50	0	0
Предварительная инкубация при 40°C в течение 4,5 ч. со встряхиванием при 200 об/мин, и затем добавление дополнительного количества AkAA и субстрата на основе рисового крахмала для инициирования каталитической реакции										
AkAA, мкл	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
Взвесь рисового крахмала, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ферментативная реакция при 40°C в течение 3 ч. со встряхиванием при 200 об/мин										
Надосадочную жидкость, полученную в конце реакции, разбавляли в 4 раза водой, и 40 мкл вводили для анализа HPLC высвобожденных глюкозы (G1) и мальтозы (G2)										
Площадь пика G1	5,78	6,25	5,75	5,48	6,86	7,15	7,43	6,62	6,70	6,28
Площадь пика G2	4,33	4,08	4,18	4,07	3,96	3,89	3,89	3,74	4,06	3,83
Площадь пика G1+G2	10,11	10,32	9,93	9,56	10,82	11,04	11,32	10,36	10,76	10,11
Доля в процентах от обработки №1	100	102	98	95	107	109	112	102	106	100

ПРИМЕР 4

Стабильность AkAA в присутствии панкреатина и эффект AkAA и панкреатина в отношении увеличения выхода глюкозы и снижения выхода мальтотриозы

Реакционная смесь содержала 0, 5, 10 и 20 мкл свиного панкреатина (Sigma P7545, 25 мг/мл, полученный в 0,1% NaCl), 20 мкл AkAA (209 мг/мл), 60 мкл 0,1 M Mes (pH 6,7), содержащий 5 мМ $CaCl_2$, Tween 80 (0,01% вес/об.). 0,1% раствор NaCl добавляли к конечному реакционному объему, составляющему 0,12 мл. Реакционную смесь инкубировали при 40°C в течение 3 ч., и затем добавляли субстрат на основе 1,5 мл взвеси кукурузной муки (10% вес/вес), и дополнительно инкубировали при 40°C в течение 13 ч. Полученную надосадочную жидкость подвергали 8,33–кратному разбавлению, и 40 мкл анализировали посредством HPLC в отношении глюкозы, мальтозы и мальтотриозы с применением детектора RI, как описано в примере 2.

На фигуре 2 показано, что AkAA являлась активной в условиях, моделирующих условия тонкой кишки жвачного животного. Показан как дополнительный, так и комплементарный эффект для протестированных 3 доз свиного панкреатина (Pan). Объединение AkAA и Pan увеличивало получение глюкозы и мальтозы и снижало образование/накопление мальтотриозы, что является преимущественным в питательном отношении, так как глюкоза может быть абсорбирована непосредственно, тогда как мальтоза может быть подвергнута гидролизу посредством альфа–глюкозидазы слизистой оболочки кишечника (мальтазы) (Nichols et al., 1998. Human small intestinal maltase–glucoamylase cDNA cloning, homology to sucrase–isomaltase, J. Biol. Chem. 273: 3076–3081). Панкреатин является важнейшей смесью пищеварительных ферментов для животных, особенно животных с однокамерным желудком и жвачных животных. Он содержит ферментативные компоненты, такие как трипсин, амилаза и липаза, рибонуклеаза и протеаза, продуцируемые экзокринными клетками свиной поджелудочной железы. Таким образом, панкреатин представляет собой комбинацию ферментов, обеспечивающую гидролиз белков, крахмала и жиров.

ПРИМЕР 5

Активность амилазы AtAA в отношении кукурузной муки в присутствии пепсина и панкреатина

Для проведения реакции с пепсином реакционная смесь содержала 0,1 мл 10% взвеси кукурузного крахмала (вес/вес) (Sigma S4126), полученной в 60 мМ глицин–HCl (pH 2,5), 10 мкл пепсина (Sigma P7000, 10000 ед./мл в воде) и 0,6 мкл (16,76 мг/мл) амилазы

AtAA. Реакцию проводили при 40°C в течение 3 ч. Образцы центрифугировали. Надосадочную жидкость разбавляли, фильтровали и анализировали посредством HPLC с применением детектора RI для анализа на сахар, как описано в примере 2. Реакция с панкреатином являлась такой же, как и реакция с пепсином, за исключением того, что взвесь кукурузного крахмала получали в 0,1 M Mes (pH 6,7) и добавляли 5 мкл 25 мг/мл свиного панкреатина (Pan) (Sigma P7545, растворенный в 0,1% NaCl).

На фигуре 3 показано, что альфа–амилаза AtAA *Aspergillus terreus* (AtAmy1) являлась активной при тестировании в присутствии как пепсина при значении pH 2,5, так и панкреатина при значении pH 6,7. Кроме того, AtAA и панкреатин продемонстрировали комплементарный эффект в отношении превращения всей мальтотриозы, фактически, в глюкозу, которая может быть непосредственно абсорбирована животными.

ПРИМЕР 6

Гидролиз кукурузного крахмала посредством амилаз AkAA и AcAA в присутствии рубцового сока

240 мкл бесклеточного рубцового сока смешивали с 10 мкл образцов ферментов: AkAA (209 мг/мл), AcAA (172 мг/мл), AkAA с GA *Trichoderma reesei* (TrGA) и AFP *Trichoderma reesei* (223 мг/мл) или AcAA с вариантом TrGA CS4 и AFP (125 мг/мл) (таблица 1), и инкубировали при 40°C в течение 4 ч. с последующим добавлением 250 мкл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126), растворенной в 0,1 M ацетате, содержащем 5 мМ $CaCl_2$ (pH 4,5), и дополнительно инкубировали в течение 30 мин. В конце реакции реакционные образцы фильтровали и надосадочные жидкости анализировали для определения общего содержания восстанавливающих сахаров с применением реагента, представляющего собой щелочную 3,5–динитросалициловую кислоту, (DNS) согласно Yu et al., (Yu et al, 1997. Methods for the assay of 1,5–anhydro–D–fructose and alpha–1,4–glucan lyase. Carbohydr. Res. 305:73–82) с незначительной модификацией. А именно, разбавленные реакционные образцы объемом 10 мкл переносили в 96–луночный ПЦР–планшет, содержащий 120 мкл реагента DNS. Планшет инкубировали при 95°C в течение 5 мин с последующим 5 мин охлаждением до 20°C, и затем 100 мкл таких смесей переносили в новый 96–луночный планшет, который применяли для измерения оптической плотности при 550 нм в спектрофотометре.

На фигуре 4 показано крайне незначительное снижение активности гидролиза кукурузы для всех 4 образцов ферментов, протестированных после инкубации в рубцовом соке. Присутствие ферментов GA *Trichoderma reesei* и ее варианта (CS4) и AFP *Trichoderma reesei* оказывало положительный эффект на общий гидролиз субстрата, катализируемый обоими образцами амилаз AkAA и AcAA. Обе ферментные смеси на основе амилазы/глюкоамилазы/протеазы получали с соотношением общего белка 29:70:1. Как показано на фигуре 4, амилазы AkAA, AcAA и их смеси с глюкоамилазами TrGA и CS4 и аспарагиновой протеазой AFP теряли менее 13% от их общей активности после 4 ч. предварительной инкубации в рубцовом соке при 40°C с последующей 30 мин инкубацией с кукурузным крахмалом при 40°C при значении pH 4,5 (по сравнению с необработанными смесями).

Эти результаты, полученные в смоделированных условиях рубца, указывают на то, что данные две амилазы и их смеси с глюкоамилазами и аспарагиновой пептидазой могут сохраняться в пищеварительном тракте жвачного животного.

ПРИМЕР 7

Активность амилаз AkAA и AcAA в присутствии пепсина в условиях различных значений pH

Реакционная смесь содержала 1,0 мл взвеси кукурузной муки (20% вес/вес),

полученной в 0,1 М глицин–HCl (pH 3,2), 0,1 М ацетат (pH 4,1, 4,7) или 0,1 М Mes (pH 6,0), каждый из которых содержал 5 мМ $CaCl_2$, 25 мкл AkAA (209 мг/мл) или AcAA (172 мг/мл), 25 мкл пепсина (Sigma P7000, 10000 ед./мл в воде). Реакцию проводили при 40°C в течение 2 ч. В конце реакции надосадочную жидкость, полученную посредством центрифугирования, фильтровали через 0,45 мкм фильтр и разбавляли в 20 раз. Разбавленные образцы анализировали в отношении общего содержания восстанавливающего сахара, как описано в примере 6.

На фигуре 5 показан гидролиз кукурузной муки посредством образцов AkAA и AcAA, инкубированных при значениях pH 3,2, 4,1, 4,7 и 6,0 в отсутствие или в присутствии пепсина. Амилолитическая активность, измеряемая как высвобождение общего восстанавливающего сахара посредством AkAA и AcAA, не была в значительной степени затронута присутствием пепсина по сравнению с отсутствием пепсина. Это дополнительно указывает на то, что данные две амилазы, характеризующиеся 70% идентичностью, активны в условиях, сравнимых с условиями, которые можно обнаружить в пищеварительном тракте жвачного животного: например, в одних из кислотных условий сычуга (pH 3,2), условий верхней части тонкой кишки (pH 4,1–4,7) и условий, сравнимых с условиями, обнаруженными в тонкой кишке и рубце (и те и другие при значении pH 6,0 или около pH 6,0). Таким образом, амилазы AkAA и AcAA, по всей видимости, более активны при соответствующих рубцу значениях pH, чем другие амилазы, находящиеся в настоящее время в применении в качестве кормовых добавок для животных с однокамерным желудком, такие как альфа–амилазы из *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. subtilis, Aspergillus niger и A. oryzae* (Monteiro de Souza et al., Application of microbial alpha–amylase in industry – a review. Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: 850–861).

ПРИМЕР 8

Активность смесей эндо–/экзоглюкангидролаз и эндопротеазы в присутствии панкреатина

Реакционная смесь содержала 1,0 мл взвеси кукурузной муки (20% вес/вес в 0,1 М Mes, 5 Мм $CaCl_2$ со значением pH 6,0), 25 мкл смеси ферментов AkAA+TrGA+AFP (223 мг/мл) или AcAA+CS4+AFP (125 мг/мл), 25 мкл свиного панкреатина (Sigma P7545, 25 мг/мл, полученного в 0,1% NaCl). Реакцию проводили при 40°C в течение 2 ч. В конце реакции, надосадочную жидкость, полученную посредством центрифугирования, фильтровали через 0,45 мкм фильтр и разбавляли в 20 раз. Разбавленные образцы анализировали в отношении общего содержания восстанавливающего сахара, как описано в примере 6. На фигуре 6 показано, что после 2 ч. инкубации с кукурузной мукой (20% вес/вес) при 40°C при значении pH 6,0 в присутствии панкреатина смесь ферментов AkAA+TrGA+AFP и смесь ферментов AcAA+CS4+AFP увеличивали получение восстанавливающего сахара в 4,2– и 3,8–кратном количестве соответственно. Данное исследование демонстрирует, что смеси AkAA+TrGA+AFP и AcAA+CS4+AFP, сохранившиеся при прохождении через рубец и сычуг, могут синергетически действовать с панкреатическими ферментами для способствования высвобождению сахара.

Обнаружили, что как и AkAA (пример 4), AcAA также действует синергетически совместно с панкреатином. В таблице 3 показано, что при дозировании AcAA совместно с панкреатином, генерирование восстанавливающей способности (DNS–значение) увеличивается 1,6–кратно сумме восстанавливающих способностей, генерируемых по отдельности двумя ферментами при значении pH 6,0, и соответствующая величина при значении pH 6,7 увеличивается в 1,25–кратном размере.

Реакционная смесь содержала 1 мл 20% вес/об. взвеси кукурузного крахмала в 0,1

M Mes (pH 6,0 и 6,7), содержащего 5 мМ $CaCl_2$, с 25 мкл свиного панкреатина (2,5% вес/об.) и без него и 25 мкл AcAA (17,2 мг/мл) при 40°C в течение 2 ч. Образующийся восстанавливающий сахар анализировали, как описано в примере 6.

Таблица 3. Синергетический эффект AcAA и панкреатина при значениях pH 6,0 и 6,7

Обработка	pH 6,0	pH 6,7
Контроль (без амилазы или панкреатина)	1,16	1,00
Только панкреатин минус контроль	1,96	1,80
Только AcAA минус контроль	1,24	1,06
AcAA, дозируемая вместе с панкреатином, минус контроль	5,12	3,57

ПРИМЕР 9

Активность в отношении высвобождения восстанавливающего сахара смесей эндо–, экзоглюкангидролаз и эндопротеазы с AFP в присутствии пепсина при значении pH 2,5 относительно значения pH 6,0

В таблице 4 показана активность смеси AkAA, AcAA, TrGA, CS4 и AFP в отсутствие и в присутствии пепсина при значении pH 2,5 относительно значения pH 6,0. Можно увидеть, что активность при значении pH 2,5 на 20% превышает активность при значении pH 6,0 для обеих смесей ферментов в экспериментальных условиях. Представляется преимущественным, чтобы ферменты в смесях ферментов являлись как стабильными, так и активными в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в желудке или сычуге жвачного животного, где преобладают более низкие значения pH.

Реакционная смесь содержала 1,0 мл взвеси кукурузной муки (10%, вес/вес) в 0,1 М глицин–HCl (pH 2,5), содержащей 5 мМ $CaCl_2$ или в 0,1 М Mes–NaOH (pH 6,0), содержащем 5 мМ $CaCl_2$, 25 мкл смеси ферментов AkAA+TrGA+AFP (223 мг/мл) или AcAA+CS4+AFP (125 мг/мл) и 25 мкл пепсина (10000 ед./мл). Реакцию проводили при 40°C в течение 2 ч. со встряхиванием при 300 об/мин. В конце реакции субстрат отделяли от фермента и продуктов посредством центрифугирования при 3500 об/мин в течение 5 мин с применением 96–луночного фильтр–планшета с фильтром 0,45 мкм. Фильтрат разбавляли в 2 раза и анализировали в отношении значения восстанавливающего сахара, как описано в примере 6.

Таблица 4. Активность в отношении высвобождения восстанавливающего сахара смеси эндо–, экзоглюкангидролаз и эндопротеазы, включающей AkAA, AcAA, TrGA, CS4 и AFP, в присутствии и в отсутствие пепсина при значении pH 2,5 относительно значения pH 6,0. Активность при значении pH 6,0 рассматривается как 100%

pH реакции	Контроль	Контроль +пепсин	AkAA+TrGA +AFP	AkAA+TrGA +AFP+пепсин	AcAA+CS4 +AFP	AcAA+CS4 +AFP+пепсин
pH 2,5	0,375	0,368	0,569	0,610	0,424	0,450
pH 6,0	0,390	0,395	0,547	0,587	0,624	0,612
pH 2,5 относительно pH 6,0, %			123	126	21	38

ПРИМЕР 10

Гидролиз кукурузного крахмала посредством глюкоамилазы в условиях пищеварения в тонкой кишке в присутствии панкреатина

Реакционная смесь содержала 0,5 мл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126) или взвеси кукурузной муки (10% вес/об.) в 0,1 М Mes (pH 6,0), 50 мкл панкреатина (конечная концентрация в реакционной смеси 0,25%) и глюкоамилазу в концентрации 400 ppm при конечном объеме 0,56 мл. Реакцию проводили при 40°C в течение 1 ч. со встряхиванием при 300 об/мин. В конце реакции надосадочную жидкость получали путем отделения

центрифугированием от гранул крахмала с применением настольной центрифуги и анализировали в отношении общего содержания восстанавливающего сахара посредством способа с применением реагента DNS, как описано в примере 6, а именно 10 мкл надосадочной жидкости или разбавленной надосадочной жидкости смешивали со 100 мкл реагента DNS в 96–луночном ПЦР–планшете. ПЦР–планшет затем инкубировали при 95°C в течение 5 мин с последующим 5 мин охлаждением до 20°C. 90 мкл реакционной смеси переносили в 96–луночный планшет для считывания, и показатель поглощения при 550 нм измеряли как DNS–значение.

На фигуре 7 с кукурузным крахмалом в качестве субстрата и на фигуре 8 с кукурузной мукой в качестве субстрата продемонстрировано, что все пять глюкоамилаз CS4, TrGA, Brew1, AfuGA и FvGA (более подробно см. таблицу 1) действовали с панкреатином синергетическим образом при получении восстанавливающих сахаров, на что указывают DNS–значения. Глюкоамилазы (GA) (1,4–альфа–D–глюканглюкогидролаза (EC 3.2.1.3)) катализируют гидролиз альфа–1,4– и альфа–1,6–глюкозидных связей с высвобождением бета–D–глюкозы с невосстанавливающих концов крахмала и родственных поли– и олигосахаридов (Sauer et al. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering, *Biochim. Biophys. Acta,* 1543:275–293). Таким образом, в отличие от определенных типов альфа–глюкозидаз, GA также способна к гидролизу сырого крахмала и альфа–1,4– и альфа–1,6–глюкозидных связей, обнаруженных в альфа–глюканах и их олигомерах.

На фигурах 7 и 8 показано, что свиной панкреатин и все пять GA характеризовались определенной способностью к гидролизу гранул кукурузного крахмала с наиболее высокой активностью, наблюдаемой для FvGA при значении pH 6,0 и 40°C. Значительный синергетический эффект наблюдали в случае, когда реакционная смесь содержала как GA, так и свиной панкреатин. Полагают, что такой синергизм может быть обусловлен не только панкреатической альфа–амилазой, присутствующей в продукте на основе панкреатина, приобретенном у Sigma, но также вероятно обусловлен протеазами, также присутствующими в данном продукте на основе панкреатина, которые могут взаимодействовать с любым белком, который может присутствовать на поверхности гранул кукурузного крахмала, а также внутри гранул.

Данный пример показывает, что глюкоамилазы могут действовать с панкреатическими пищеварительными ферментами синергетическим образом при генерировании глюкозы из кукурузы с химическим составом, приведенным в примере 2. Все пять GA, применяемых в данном эксперименте, и три альфа–амилазы AkAA, AcAA и AtAA, применяемые в примерах 2–9 выше, имеют связывающие углевод модули, принадлежащие к семейству 20 (CBM20) (Christiansen et al., 2009. The carbohydrate–binding module family 20 – diversity, structure, and function, FEBS Journal, 276: 5006–5029; Janeceka et al., 2011. Structural and evolutionary aspects of two families of non–catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. Enzyme and Microbial Technology, 49: 429– 440). Такие ферменты могут иметь дополнительный связывающий углевод сайт вблизи связывающего углевод модуля (Sorimachi et al., 1997. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to beta–cyclodextrin, Structure, 5:647–661). Эти связывающие углевод модули и связывающие углевод сайты, вероятно, являются необходимыми для обеспечения активности в отношении гранул крахмала и мальтосахаридов и, таким образом, способствуют синергетическому эффекту при комбинации с панкреатином.

ПРИМЕР 11

Гидролиз кукурузного крахмала посредством глюкоамилазой в характерных для рубца

условиях

В таблице 5 показано, что остаточная активность для пяти глюкоамилаз составляет по меньшей мере 80% после 4 ч. инкубации в рубцовом соке в отсутствие субстрата, представляющего собой крахмал, за исключением AfuGA, которая характеризуется 65% остаточной активностью. Что касается кормового фермента для жвачных животных, необходимо, чтобы он характеризовался значительной стабильностью в рубцовом соке при 40°C в течение 4 ч.

Таким образом, такие ферменты демонстрируют применимость в качестве кормовых ферментов для жвачных животных, так как они являлись стабильными и сохраняли активность в рубцовом соке при 40°C в течение 4 ч.

Смесь для предварительной инкубации содержала 0,25 мл бесклеточного рубцового сока, 5 мкл каждой из 5 глюкоамилаз в концентрации 400 ppm. Предварительную инкубацию проводили при 40°C в течение 4 ч. со встряхиванием при 300 об/мин в 48–луночном планшете. Для контроля время предварительной инкубации было нулевым. После предварительной инкубации добавляли 0,25 мл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126) (10% вес/об.) в 0,1 M Mes (pH 6,0) и реакцию проводили в течение 30 мин при 40°C со встряхиванием. Надосадочную жидкость получали путем отделения центрифугированием от гранул крахмала с применением настольной центрифуги и анализировали в отношении общего содержания восстанавливающего сахара посредством способа с применением DNS, как описано в примере 10.

Таблица 5. Стабильность пяти глюкоамилаз в присутствии рубцового сока при 40°C в течение 4 ч.

Глюкоамилазы	Остаточная активность в отношении кукурузного крахмала (%)
CS4	81
TrGA	98
Brew1	86
AfuGA	65
FvGA	80

ПРИМЕР 12

Активность пяти глюкоамилаз при значении pH 2,5 относительно pH 6,0 в присутствии пепсина

Представляется преимущественным, чтобы ферменты являлись как стабильными, так и активными в условиях, моделирующих условия, обнаруженные в желудке или сычуге жвачного животного, где преобладают более низкие значения pH. Активность при значении pH 2,5 должна быть весьма высокой, в достаточной степени для того, чтобы оказывать значимое влияние на перевариваемость в данной пищеварительной камере с низким значением pH относительно активности в рубце и тонкой кишке со значением pH, составляющим около 6, при использовании рациона на основе крахмала. В таблице 6 показано, что все пять глюкоамилаз, характеризовались более чем 20% активностью при значении pH 2,5 по сравнению с их активностью при значении pH 6,0. Таким образом, сбалансированная активность в рубце, сычуге и тонкой кишке увеличит способность к перевариванию питательных веществ крахмала.

Реакционная смесь в 48–луночном микропланшете содержала 0,5 мл взвеси кукурузной муки (10% вес/об.), полученной в глицин–HCl (60 мМ, pH 2,5) или в Mes–NaOH (100 мМ, pH 6,0), 50 мкл свиного пепсина (конечная концентрация 1000 ед./мл) и 5 мкл глюкоамилазы (конечная концентрация 400 ppm). Реакцию проводили при 40°C в течение 60 мин. Высвобожденный восстанавливающий сахар анализировали с применением реагента DNS, как описано в примере 10. Активность при значении pH 6,0 рассматривали

как 100%.

Таблица 6. Коэффициент активности пяти глюкоамилаз при значениях pH 2,5 и pH 6,0. Активность при значении pH 6,0 для каждого фермента рассматривают как 100%

Глюкоамилазы	pH 2,5	pH 6,0	pH 2,5 относительно pH 6,0, %
CS4	0,497	0,793	63
TrGA	0,498	0,778	64
Brew1	0,491	0,578	85
AfuGA	0,663	0,715	93
FvGA	0,220	0,692	32

ПРИМЕР 13

Высвобождение глюкозы из кукурузного крахмала дрожжевой альфа–глюкозидазой в присутствии панкреатина в условиях, моделирующих условия в тонкой кишке

Реакционная смесь содержала 0,5 мл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126) (10% вес/об.), суспендированного в 0,1 М Mes (pH 6,0), содержащего 5 мМ $CaCl_2$, 0, 10, 20 или 35 мкл дрожжевой альфа–глюкозидазы (которую также можно обозначать как мальтазу, приобретенную у Megazyme, E–MALTS, 1000 ед./мл), 0–25 мкл свиного панкреатина (2,5% вес/об. в 1% NaCl, приобретенного у Sigma, кат. № P7545) и 0–60 мкл воды с общим объемом, составляющим 0,56 мл. Реакционные смеси инкубировали в инкубаторе со встряхиванием при 40°C в течение 60 мин в 48–луночном планшете. Планшет центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин с применением настольной центрифуги для отделения непереваренных гранул крахмала. Полученную надосадочную жидкость переносили в 96–луночный планшет для анализа на глюкозу с применением набора для анализа на глюкозу на основе оксидазы/пероксидазы глюкозы (GOPOD).

Для проведения GOPOD–анализа на глюкозу 8 мкл надосадочной жидкости переносили в 96–луночный планшет для считывания, содержащий 240 мкл реагента GOPOD от Megazyme (K–GLUC 09/14). Планшет инкубировали при 50°C в течение 20 мин и показатель поглощения при 510 нм считывали в соответствии с инструкцией от Megazyme.

Хорошо известно, что продукт на основе панкреатина (Sigma P7545) содержит панкреатическую альфа–амилазу, липазу, рибонуклеазу и несколько протеаз, в том числе трипсин, химотрипсин, эластазу. Продукты гидролиза пищевого крахмала посредством свиной и бычьей альфа–амилазами представляют собой в основном мальтозу (Banks et al., 1976. The action pattern of bovine pancreatic alpha–amylase. Intl J. Biochem., 7: 107–110). Известно, что животные, в том числе животные с однокамерным желудком и жвачные животные, гидролизуют мальтозу посредством мембраносвязанного фермента тонкой кишки (Nichols et al., 1998. Human Small Intestinal Maltase–glucoamylase cDNA Cloning, homology to sucrase–isomaltase, J. Biol. Chem. 273: 3076–3081). Свободно перемещающийся фермент характеризуется более высокой каталитической эффективностью, чем мембраносвязанный (иммобилизированный) фермент.

На фигуре 9 показано, что без панкреатина дрожжевая альфа–глюкозидаза, дозированная от 0, 10, 20 до 35 мкл, не обладала способностью к увеличению высвобождения глюкозы из гранул кукурузного крахмала.

Однако, в присутствии 2,5 мкл панкреатина происходило высвобождение глюкозы и добавление 10 мкл альфа–глюкозидазы удваивало количество высвобожденной глюкозы. Выход глюкозы увеличивался дополнительно при увеличении дозы альфа–глюкозидазы. Это указывает на то, что дрожжевая альфа–глюкозидаза действовала с ферментами, присутствующими в панкреатине, синергетическим образом

при высвобождении глюкозы из кукурузного крахмала. Полагают, что протеазы, присутствующие в панкреатине, могут способствовать в некоторой степени данному синергизму, так как протеаза может осуществлять гидролиз белков, присутствующих на поверхности гранул крахмала, а также белков, находящихся внутри гранулы. Такие белки, находящиеся на поверхности и внутри гранул крахмала, могут отрицательно влиять на переваривание крахмала (McAllister et al., 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms.*J. Anim. Sci.* 71:205–212).

Альфа–глюкозидаза, применяемая в примере 13, является высокоочищенной формой из *Saccharomyces cerevisiae*, приобретенной у Megazyme International Ireland (EC 3.2.1.20, семейство по CAZy: GH13, позиции в базе данных по белкам: P53341, P38158, CAS: 9001–42–7). Данный пример демонстрирует, что свободная форма микробной альфа–глюкозидазы характеризуется значительным синергизмом в сочетании с панкреатическими пищеварительными ферментами. Однако, было обнаружено, что данная дрожжевая альфа–глюкозидаза является нестабильной и неактивной в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в желудке и сычуге жвачного животного. Полагают, что могут потребоваться дополнительные манипуляции, такие как нанесение покрытия на данную дрожжевую альфа–глюкозидазу или белковая инженерия, для придания стабильности при таких низких значениях pH в присутствии пепсина, чтобы она была способна функционировать в тонкой кишке жвачного животного.

ПРИМЕР 14

Высвобождение глюкозы из кукурузного крахмала посредством грибной альфа–глюкозидазы в присутствии панкреатина в условиях, моделирующих условия тонкой кишки

Три грибные альфа–глюкозидазы TG L–2000, Aclglu1 и Nfiglu1 (таблица 1) исследовали в отношении стабильности и активности в присутствии пепсина, панкреатина и рубцового сока (таблицы 7.1, 7.2 и 7.3 ниже). В таблицах 7.1–7.3 показано, что все три альфа–глюкозидазы действовали с панкреатином синергетическим образом в отношении увеличения высвобождения глюкозы из кукурузного крахмала.

Исследование синергетического эффекта с панкреатином проводили следующим образом: 0,5 мл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126) (10% вес/об.) в 0,1 M Mes (pH 6,0), содержащем 5 мМ $CaCl_2$, инкубировали с 0 или 2,5 мкл альфа–глюкозидазы TG L–2000 (3,1 мг/мл) и 0 или 2,5 мкл свиного панкреатина (Sigma P7545, 2,5% вес/об. в 1% NaCl). Реакцию проводили при 40°C в течение 1 ч. Реакционную смесь затем фильтровали через 0,22 мкм фильтр. Высвобожденную глюкозу в фильтрате анализировали с применением набора для анализа на глюкозу от Megazyme (GOPOD) (K–GLUC 09/14) (как описано в примере 13 выше) и анализ поводили следующим образом: 8 мкл фильтрата смешивали с 0,24 мл реагента GOPOD в 96–луночном планшете и производили считывание при 510 нм после инкубации при 50°C в течение 20 мин. Единицы измерения OD, измеренной при 510 нм, использовали в качестве количественного показателя высвобождения глюкозы.

Исследование синергетического эффекта с пепсином и панкреатином (Pan) проводили следующим образом: смесь для предварительной инкубации содержала 0,1 мл глицин–HCl (pH 3,0), 5 мМ CaCl2, 25 мкл свиного пепсина (Sigma P7000, 5000 ед./мл) и 2,5 мкл TG L–2000. Данную смесь инкубировали при 4°C в течение 2 ч. В конце инкубации 0,5 мл взвеси кукурузного крахмала (10%, вес/об.) в 0,1 M Mes (pH 6,0) и 2,5 мкл панкреатина (2,5%) добавляли и дополнительно инкубировали при 40°C в течение 1 ч. Анализ высвобожденной глюкозы проводили, как описано выше, в соответствии с исследованием панкреатина с применением набора для анализа на глюкозу от Megazyme.

Исследование стабильности и взаимодействия с рубцовой гидролазой крахмала проводили следующим образом: 2,5 мкл альфа–глюкозидазы TG L–2000 с 0,24 мл бесклеточного рубцового сока и инкубация при 40°C в течение 4 ч. В конце инкубации добавляли 0,25 мл кукурузного крахмала (10% вес/об.) в 0,1 М ацетата (pH 4,5) и дополнительно инкубировали при 40°C в течение 30 мин. Высвобожденную глюкозу анализировали с применением набора для анализа на глюкозу от Megazyme, как описано выше для исследования панкреатина.

Альфа–глюкозидаза и свиной панкреатин, применяемые по отдельности, обеспечивали ограниченное высвобождение глюкозы из кукурузного крахмала (таблица 7.1). Комбинация альфа–глюкозидазы TG L–2000 и панкреатина обеспечивала высвобождение глюкозы в количестве в 5,2 раза выше, чем сумма отдельных показателей высвобождения глюкозы для каждого из двух ферментных препаратов (таблица 7.1). Подобным образом при комбинации Aclglu1 и Nfiglu1 с панкреатином в тех же условиях увеличение высвобождения глюкозы было 8,3–кратным (таблица 7.2) и 7,8–кратным (таблица 7.3) по сравнению с суммой отдельных показателей высвобождения для Aclglu1 и панкреатина или для Nfiglu1 и панкреатина соответственно.

Стабильность в отношении пепсина трех альфа–глюкозидаз тестировали при значении pH 3,0 в присутствии пепсина (таблица 7.1). Представляется очевидным, что комбинация 2,5 мкл альфа–глюкозидазы TG L–2000 и панкреатина 7,3–кратно увеличивала высвобождение глюкозы даже после предварительной инкубации с пепсином в отсутствие субстрата при значении pH 3,0 и 40°C в течение 2 ч. (таблица 7.1). Для альфа–глюкозидаз Aclglu1 и Nfiglu1, протестированных в тех же условиях, увеличение высвобождения глюкозы посредством комбинации являлось 4,1–кратным (таблица 7.2) и 6,9–кратным (таблица 7.3). Все три альфа–глюкозидазы продемонстрировали стабильность в отношении пепсина, поскольку, несмотря на предварительную инкубацию с пепсином, каждая из них по–прежнему демонстрировала синергетический эффект при комбинации с панкреатином в аналитической смеси.

Подобным образом, оценивали синергетический эффект и стабильность трех альфа–глюкозидаз в рубцовом соке (таблицы 7.1–7.3). В таблице 7.1 показано, что для альфа–глюкозидазы TG L–2000, добавленной в рубцовый сок, высвобождение глюкозы увеличивалось 2,0–кратно по сравнению с суммарным количеством глюкозы, высвобожденной отдельно посредством альфа–глюкозидазы TG L–2000 и рубцового сока и с предварительной инкубацией в рубцовом соке в присутствии TG L–2000 высвобождение глюкозы также увеличивалось 2,0–кратно по сравнению со значением высвобождения в отсутствие альфа–глюкозидазы (таблица 7.1), означая, что данная альфа–глюкозидаза TG L–2000 стабильна в рубцовом соке. Что касается альфа–глюкозидаз Aclglu1 и Nfiglu1, то их присутствие привело к 2,0– и 2,8–кратному увеличению высвобождения глюкозы соответственно для "обработок без предварительной инкубации и с предварительной инкубацией" (таблица 7.2–7.3) с рубцовым соком.

Таблица 7.1. Синергетический эффект альфа–глюкозидазы TG L–2000 из *Aspergillus niger* с панкреатином (Pan), амилолитическая активность в рубцовом соке и устойчивость в присутствии пепсина при высвобождении глюкозы (G1) из кукурузного крахмала. Число повторностей (n) составляло 2–4

	Без Pan	С Pan	С Pan	Пепсин+Pan с инкубацией при 40°C в течение 2 ч.	Пепсин + Pan с инкубацией при 40°C в течение 2 ч.	Без предварительной инкубации с рубцовым соком	Без предварительной инкубации с рубцовым соком	С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°C в течение 4 ч.	С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°C в течение 4 ч.

TG L–2000	+	–	+	–	+	–	+	–	+
OD510 нм	0,16	0,086	1,29	1,175	8,544	0,494	0,885	0,982	1,822
Стандартное отклонение	0,005	0,001	0,014	0,145	0,276	0,199	0,05	0,117	0,11
Кратность увеличения высвобождения G1 вследствие добавления TG L–2000			5,2		7,3		2,0		2,0
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

Таблица 7.2. Синергетический эффект альфа–глюкозидазы из *Aspergillus clavatus* (Aclglu1) с панкреатином (Pan), амилолитическая активность в рубцовом соке и устойчивость в присутствии пепсина при высвобождении глюкозы (G1) из кукурузного крахмала.

Условия реакции и анализа являлись такими же, как и для таблицы 7.1, за исключением того, что использовали 0 или 50 мкг альфа–глюкозидазы Aclglu1 (таблица 1) из *A. clavatus*. Число повторностей (n) составляло 2–4

	Без Pan	**С Pan**	**С Pan**	**Пепсин+Pan с инкубацией при 40°С в течение 2 ч.**	**Пепсин+Pan с инкубацией при 40°С в течение 2 ч.**	**Без предварительной инкубации с рубцовым соком**	**Без предварительной инкубации с рубцовым соком**	**С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°С в течение 4 ч.**	**С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°С в течение 4 ч.**
Aclglu1	+	–	+	–	+	–	+	–	+
OD510 нм	0,06	0,086	1,22	1,175	4,845	0,494	0,75	0,982	2,05
Стандартное отклонение	0,003	0,001	0,013	0,145	0,52	0,199	0,03	0,117	0,08
Кратность увеличения высвобождения G1 вследствие добавления Aclglu1			8,3		4,1		2,0		2,8
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

Таблица 7.3. Синергетический эффект альфа–глюкозидазы из *Neosartorya fischeri* (Nfiglu1) с панкреатином (Pan), амилолитическая активность в рубцовом соке и устойчивость в присутствии пепсина при высвобождении глюкозы (G1) из кукурузного крахмала.

Условия реакции и анализа являлись такими же, как описано выше в отношении таблицы 7.1, за исключением того, что использовали 0 или 50 мкг альфа–глюкозидазы Nfiglu1 из *N. fischeri*. Число повторностей (n) составляло 2–4

	Без Pan	**С Pan**	**С Pan**	**Пепсин+Pan с инкубацией при 40°С в течение 2 ч.**	**Пепсин+Pan с инкубацией при 40°С в течение 2 ч.**	**Без предварительной инкубации с рубцовым соком**	**Без предварительной инкубации с рубцовым соком**	**С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°С в течение 4 ч.**	**С предварительной инкубацией с рубцовым соком при 40°С в течение 4 ч.**
Nfiglu1	+	–	+	–	+	–	+	–	+
OD510 нм	0,08	0,086	1,29	1,175	8,12	0,494	0,73	0,982	2,06
Стандартное отклонение	0,002	0,001	0,077	0,145	0,13	0,199	0,01	0,117	0,00
Кратность увеличения высвобождения G1 вследствие добавления Nfiglu1			7,8		6,9		2,0		2,8
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

ПРИМЕР 15

Стабильность грибной альфа–глюкозидазы в рубцовом соке и взаимодействие с панкреатином при высвобождении глюкозы

Смесь для предварительной инкубации содержала 50 мкг каждой из грибных альфа–глюкозидаз TG L–2000, Aclglu1, Nfiglu1, TauSec098 и TauSec099 (таблица 1), растворенных в 2,5 мкл и 240 мкл бесклеточного рубцового сока, смешанных в лунках 24–луночного планшета. В контрольный образец альфа–глюкозидазу не добавляли. Смеси инкубировали при 40°C в течение 4 ч. В конце инкубации добавляли 250 мкл взвеси кукурузного крахмала (10% вес/об., Sigma S4126), растворенной в 0,1 M Mes, 5 мМ $CaCl_2$ (pH 6) и 2,5 мкл панкреатина (Sigma P7545 в 0, 1% NaCl, 2,5%, вес/об.), и реакцию проводили при 40°C в течение 30 мин (n=4). Полученную надосадочную жидкость после центрифугирования разбавляли в 10 раз и высвобожденную глюкозу количественно определяли как описано в примере 13 с применением набора для анализа на глюкозу от Megazyme.

На фигуре 10 показано, что предварительная инкубация пяти альфа–глюкозидаз в рубцовом соке при 40°C в течение 4 ч. не вызывала потери активности по сравнению с обработкой "без предварительной инкубации". Как представляется, большее количество глюкозы высвобождалось в образцах с предварительной инкубацией, чем высвобождалось в образцах, которые не подвергали предварительной инкубации (фигура 10). Это, вероятно, свидетельствует о том, что такие альфа–глюкозидазы взаимодействовали с гидролазами крахмала, присутствующими в рубцовом соке, который содержал остаточный уровень субстрата, представляющего собой крахмал.

Пример 16

Синергетический эффект пяти альфа–глюкозидаз с панкреатином при высвобождении глюкозы из кукурузного крахмала при значении pH 6,0

Реакционная смесь содержала 0,5 мл взвеси кукурузного крахмала (Sigma S4126) (10% вес/об.) в 0,1 M Mes (pH 6,0), содержащего 5 мМ $CaCl_2$, 50 мкг альфа–глюкозидазы в 2,5 мкл и 0 или 2,5 мкл раствора панкреатина (Sigma P7545, 2,5% вес/об. в 0,1% NaCl). В контрольный образец добавление альфа–глюкозидаз не осуществляли. Реакцию проводили при 40°C в течение 60 мин (n=4) и высвобожденную глюкозу количественно определяли с применением набора для анализа на глюкозу, описанного в примере 13.

На фигуре 11 показано, что получение глюкозы для контроля с применением только панкреатина и без дополнительного фермента было ограниченным (0,67 мг/мл в реакционной смеси). При использовании только альфа–глюкозидазы высвобождение глюкозы являлось низким, за исключением TG L–2000, которая продемонстрировала высвобождение глюкозы, составляющее 0,80 мг/мл в реакционная смеси. При совместном применении альфа–глюкозидазы и панкреатина высвобождение глюкозы увеличивалось в диапазоне, составляющем 11–20–кратное увеличение, в зависимости от количества использованной альфа–глюкозидазы. Это иллюстрирует синергетический эффект при высвобождении глюкозы из кукурузного крахмала, который можно получать при применении любой из пяти альфа–глюкозидаз и панкреатина.

Пример 17

Активность альфа–глюкозидаз, обработанных пепсином, при значениях pH 2,5 и pH 6,0

Реакционная смесь содержала 50 мкг пяти альфа–глюкозидаз TG L–2000, Aclglu1, Nfiglu1, TauSec098 и TauSec099 (таблица 1) в 2,5 мкл, 75 мкл пепсина (Sigma P7000, исходный раствор 5000 ед./мл) и 1,5 мл мальтозы (21,5 мг/мл) в 0,1 M глицин–HCl, содержащей 5 мМ $CaCl_2$ со значением pH 2,5 или в 0,1 M Mes–NaOH, содержащего 5 мМ $CaCl_2$ со значением pH 6,0. Реакцию проводили при 40°C в течение 30 мин. В конце

реакции реакционную смесь затем разбавляли в 10 раз и анализировали в отношении высвобождения глюкозы с применением набора для анализа на глюкозу от Megazyme, как описано в примере 13 выше.

Таблица 8. Соотношение активности при значениях pH 2,5 и pH 6,0 для пяти альфа–глюкозидаз. Активность при значении pH 6,0 рассматривается как 100%

Глюкозидазы	Активность при значении pH 2,5 относительно pH 6,0 (%)
TG L–2000	138
Aclglu1	107
Nfiglu1	84
TauSec098	120
TauSec099	167

В таблице 8 показано, что все четыре глюкозидазы являлись более активными при значении pH 2,5, чем при значении pH 6,0 в присутствии пепсина, за исключением Nfiglu1, которая характеризовалась 84% активностью при значении pH 2,5 по сравнению с значением pH 6,0. Таким образом, такие ферменты демонстрируют применимость в качестве кормовых ферментов для жвачных животных, так как они являлись стабильными и сохраняли активность в рубцовом соке при 40°C в течение 4 ч.

Пример 18

Применение глюкоамилаз в комбинации с металлопептидазами P14L и P7L с обеспечением увеличения переваривания сухого вещества и газообразования при ферментации кукурузы в рубце

Эффекты 4 глюкоамилаз (CS4, TrGA, AfuGA, FvGA) и двух металлопептидаз/протеаз (P14L, P7L) и их комбинаций в отношении переваривания сухого вещества (DMD) и газообразования при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации/ферментации оценивали как описано ниже. Как глюкоамилазы, так и протеазы применяли в концентрации 0,25 мг/г.

Эффекты 4 глюкоамилаз (CS4, TrGA, AfuGA, FvGA) и двух металлопептидаз/протеаз (P14L, P7L) и их комбинаций оценивали в отношении микробной ферментации в рубце с применением зубовидной кукурузы в качестве субстрата для периодической культуры рубцового сока *in vitro*. Эксперименты основывали на протоколе, установленном и опубликованном ранее (Adesogan, A.T., Krueger, N.A., и Kim, S.C. 2005. Anim. Feed Sci. Technol. 123: 211–223). Зубовидная кукуруза, применяемая в данной системе периодической ферментации *in vitro*, содержала 88,8% сухого вещества (DM), 9,3% неочищенного белка (CP), 3,2% кислотно–детергентного волокна (ADF), 8,3% нейтрально–детергентного волокна, обработанного амилазой (aNDF), 76,9% неволокнистых углеводов (NFC), 88,0% общего количества перевариваемых питательных веществ (TDN). Ее измельчали до 4 мм. Все ферменты применяли в количестве 0,25 мг белка, представляющего собой фермент, на грамм зубовидной кукурузы в трех отдельных сериях с 4 повторностями на обработку и ферментация или инкубация продолжалась 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. при 39°C. Измельченную зубовидную кукурузу взвешивали в 6 повторностях на серию в фильтровальных мешках F57 (ANKOM Technology, Macedon, NY). Перед помещением во флаконы ферменты разбавляли в 0,1 М цитратно–фосфатном буфере (pH 6,0) и добавляли к 0,5 г измельченной зубовидной кукурузы в мешках F57 (Krueger, N. A., and A. T. Adesogan. 2008. Anim. Feed Sci. Tech. 145: 84–94; Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Agric. Handbook No. 379. ARS USDA, Washington, DC, pp. 20). Фильтровальные мешки F57 герметично закрывали с помощью настольного устройства для запаивания полиэтиленовых пакетов от Uline (Impulse® типа AIE–200), затем немедленно помещали в сосуды для ферментации, которые представляли собой флаконы объемом 160 мл с резиновой пробкой. Также

предусматривали пустые флаконы, содержащие только фильтровальный мешок, а также контрольные образцы, содержащие только молотую зубовидную кукурузу без фермента. Рубцовый сок репрезентативным образом отбирали из трех лактирующих молочных коров Holstein с канюлированием рубца через 2–3 ч. после употребления полнорационной кормосмеси (TMR). Ингредиентный состав TMR, даваемой в пищу молочным коровам с наложенной фистулой, основывался на сухом веществе, состоящем из 38,2% кукурузного силоса, 27,3% молотой обмолоченной кукурузы, 14,5% соевой муки с 44% неочищенного белка, 9,1% цитрусового жома, 4,5% премикса для кормления на открытых кормовых площадках, 4,0% сена из люцерны в середине цветения, 1,8% энергетической усиливающей добавки (MS Specialty Nutrition, Данди, Иллинойс), 0,5% Novasil (BASF, Германия), составляя в сумме 100%.

Собранный рубцовый сок фильтровали через четыре слоя марли перед смешиванием с предварительно подогретой искусственной слюной (39°C). Состав искусственной слюны включал микроминеральный раствор $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeCl_2 \cdot 6H_2O$; макроминеральный раствор $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; буферный раствор $(NH_4)_2HCO_3$ и $NaHCO_3$; триптиказо–пептонный раствор (триптон, Sigma–Aldrich, Сент–Луис, Миссури, США); окислительно–восстановительный индикатор резазурин и восстанавливающий раствор, содержащий цистеин–HCl, 1 M NaOH, $Na_2S \cdot 9H_2O$, и дистиллированную воду. Объемное соотношение между рубцовым соком и искусственной слюной составляло 1:2. Забуференный рубцовый сок (52 мл) добавляли во флаконы объемом 160 мл с резиновой пробкой, содержащие фильтровальные мешки, и флаконы закрывали с помощью резиновых пробок и закупоривали с помощью алюминиевых пломб. Флаконы инкубировали в течение 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. при 39°C в инкубаторе с принудительной вентиляцией. В конце инкубации фильтровальные мешки, содержащие остатки, сушили в печи при 60°C в течение 48 ч. и взвешивали с целью количественного определения DMD. Давление газа внутри флаконов измеряли с помощью преобразователя давления и апостериорно преобразовывали в объем газа при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации. Следующую формулу применяли для преобразования давления газа в объем газа:

объем газа (мл) = (давление газа (фунтов/кв. дюйм) * 4,8843) + 3,1296.

Уравнение составляли на основе экспериментальных условий с применением флаконов объемом 160 мл с резиновой пробкой и применяли для всех экспериментов из таблиц 9.1–9.2.

Статистический анализ. Для всех экспериментов в примере 18 собранные данные анализировали с применением процедуры GLIMMIX SAS (версия 9.1; SAS Institute, Кэри, Северная Каролина). Эксперименты разрабатывали в виде полностью рандомизированной блочной схемы, где каждая серия рассматривалась как блок. Дозу использовали в качестве фиксированного эффекта в модели при тестировании ферментов в различных дозах. Переменная отклика включала DMD и газообразование in–vitro. Серию рассматривали как случайный фактор. Фиксированные эффекты модели включали время отбора проб в отношении параметров ферментации, измеряемых в разные часы после инкубации. Процедуру UNIVARIATE SAS применяли для тестирования остатков на выпадающие значения и нормальность, перед тем как проводили окончательные анализы. Эффекты обработок считали статистически значимыми при $P < 0,05$, тогда как любые тренды определяли при $0,05 \leq P \leq 0,10$.

Результаты оценки четырех глюкоамилаз (CS4, TrGA, AfuGA, FvGA) и двух металлопептидаз/протеаз (P14L, P7L) и их комбинаций в отношении переваривания

сухого вещества (DMD) и газообразования при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации/ферментации можно найти в таблицах 9.1.1–9.1.4. Как глюкоамилазы, так и протеазы применяли в концентрации 0,25 мг/г.

Обработка CS4+/–P14L. Не наблюдали выраженных эффектов в отношении DMD в ответ на добавление CS4 при 0, 3 и 7 ч. инкубации или ферментации (таблица 9.1.1). Однако, DMD улучшалось на 56, 36 и 25% при 9, 12 и 24 ч. инкубации соответственно ($P < 0,05$). Подобным образом, протеаза P14L улучшала DMD на 79, 59 и 32% при 9, 12 и 24 ч. инкубации соответственно ($P < 0,05$). Комбинация CS4 и P14L улучшала DMD на 109, 86 и 45% при 9, 12 и 24 ч. инкубации соответственно ($P < 0,05$).

Обработка TrGA+/–P14L DMD увеличивалось на 62% и 79% с TrGA и P14L при 9 ч. инкубации соответственно (таблица 9.1.2). Комбинация обоих ферментов при 9 ч. инкубации увеличивала DMD до 124% по сравнению с контролем ($P < 0,01$).

Обработка AfuGA+/–P14L Эффекты комбинации AfuGA и P14L в отношении параметров ферментации в рубце представлены в таблице 9.1.3. DMD увеличивалось при 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации с AfuGA, P14L и комбинацией ($P < 0,05$). Эффекты обоих ферментов в комбинации являются очевидными, так как это увеличивало DMD на 119, 146, 108 и 60% при 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации соответственно, и величина эффектов являлась выше, чем та, которую ферменты обеспечивали по отдельности ($P < 0,05$).

ОбработкаFvGA+/–P14L Эффекты комбинации FvGA и P14L в отношении параметров ферментации в рубце представлены в таблице 9.1.4. Не наблюдали никаких эффектов в отношении DMD в ответ на добавление FvGA при 0, 3 и 7 ч. инкубации; однако, DMD улучшалось на 42, 79 и 93% при 9 ч. инкубации ($P < 0,01$) с FvGA, P14L и их комбинацией соответственно.

Было установлено, что все четыре глюкоамилазы, металлопептидаза P14L и их комбинации увеличивали газообразование при ферментации в значительной степени по меньшей мере при 12 и 24 ч. инкубации ($P < 0,05$) (таблицы 9.1.1–9.14).

ОбработкаCS4, TrGA, AfuGA, FvGA +/– P7L Эффекты комбинации 4 глюкоамилаз (CS4, TrGA, AfuGA, FvGA) с металлопептидазой/протеазой P7L в отношении DMD при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации/ферментации представлены в таблицах 9.2.1–9.2.4. Аналогично с таблицами 9.1.1–9.1.4, как глюкоамилазы, так и протеазу применяли в концентрации 0,25 мг/г.

Основываясь на наблюдаемых результатах, синергетический или дополнительный эффекты 4 глюкоамилаз в комбинации с P7L наблюдаются вне зависимости от времени инкубации. Дополнительные эффекты при комбинации CS4 и P7L обеспечивали улучшение DMD на 49, 112, 72, 60, 55 и 19% при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. инкубации соответственно (таблица 9.2.1; $P < 0,01$). DMD также увеличивалось на 41, 109, 73, 64, 60 и 25% при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. соответственно при комбинации TrGA и P7L (таблица 9.2.2; $P < 0,01$).

Комбинация AfuGA (таблица 9.2.3) и P7L улучшала DMD на 23, 116, 85, 66, 58 и 21% при 0, 3, 7, 9, 12 и 24 ч. соответственно ($P < 0,01$). Несмотря на эффективность FvGA в комбинации с P7L в отношении улучшения DMD при 3, 7, 9 и 12 ч. инкубации, при 0 и 24 ч. по сравнению с контролем никаких эффектов не наблюдали (таблица 9.2.4). Об улучшении DMD дополнительно свидетельствовал более высокий суммарный объем газа, наблюдаемый в большинстве из временных точек инкубации для всех 4 глюкоамилаз, протеазы P7L и их комбинаций ($P < 0,05$) (таблицы 9.2.1–9.2.4).

Таблица 9.1. 1. Эффекты CS4 и протеазы (P14L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. [a–c] Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются ($P < 0,05$)

Время, ч.	Контроль	CS4	P14L	Комбинация	SE	P–значение
Перевариваемость сухого вещества, %						
0	7,2	8,64	9,97	9,5	2,16	0,81
3	11,95	15,7	22,21	23,49	4,42	0,28
7	13,48	18,46	19,35	24,16	2,76	0,13
9	$16,07^{c}$	$25,15^{b}$	$28,81^{ab}$	$33,71^{a}$	1,60	<0,01
12	$23,63^{b}$	$32,27^{ab}$	$37,47^{ab}$	$44,04^{a}$	4,32	0,05
24	42^{b}	$52,59^{ab}$	$55,49^{a}$	$61,04^{a}$	4,04	0,05
Объем газа, мл						
0	2,79	3,0	2,84	2,95	0,59	0,99
3	9,72	9,92	10,81	10,69	0,63	0,55
7	19,5	19,69	21,82	22,85	1,67	0,45
9	30,75	33,69	32,04	38,93	2,42	0,16
12	$47,87^{b}$	$53,87^{ab}$	$50,29^{b}$	$62,54^{a}$	3,13	0,04
24	$75,49^{c}$	$91,12^{ab}$	$79,4^{bc}$	$99,7^{a}$	4,69	0,02

Таблица 9.1. 2. Эффекты TrGA и протеазы (P14L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. $^{a–c}$ Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются ($P < 0,05$)

Время, ч.	Контроль	TrGA	P14L	Комбинация	SE	P–значение
Перевариваемость сухого вещества, %						
0	7,2	8,23	9,97	10,22	1,71	0,57
3	11,95	16,65	22,20	25,81	8,02	0,17
7	13,48	20,65	19,35	26,11	3,28	0,13
9	$16,07^{c}$	$26,11^{b}$	$28,81^{b}$	$36,01^{a}$	1,54	<0,01
12	$23,62^{b}$	$34,11^{ab}$	$37,47^{a}$	$44,05^{a}$	4,14	0,05
24	42^{b}	$56,75^{a}$	$55,49^{ab}$	$63,63^{a}$	4,17	0,04
Объем газа, мл						
0	2,79	3,09	2,84	3,01	0,51	0,97
3	9,72	10,08	10,82	12,31	0,87	0,23
7	19,5	20,7	21,82	23,56	1,98	0,54
9	30,75	35,57	32,05	41,69	2,70	0,08
12	$47,87^{b}$	$56,28^{ab}$	$20,29^{b}$	$65,99^{a}$	3,42	0,02
24	$75,49^{b}$	$97,24^{a}$	$79,41^{b}$	$106,26^{a}$	5,09	<0,01

Таблица 9.1. 3. Эффекты AfuGA и протеазы (P14L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. $^{a–c}$ Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются ($P < 0,05$)

Время, ч.	Контроль	AfuGA	P14L	Комбинация	SE	P-значение
Перевариваемость сухого вещества, %						
0	7,2	10,19	9,97	11,94	2,02	0,46
3	11,95	18,48	22,20	26,42	4,65	0,23
7	13,48 ^{b}	23,26 ^{ab}	19,35 ^{ab}	29,57 ^{a}	3,17	0,04
9	16,07 ^{c}	30,73 ^{b}	28,81 ^{b}	39,58 ^{a}	1,56	<0,01
12	23,62 ^{b}	37,18 ^{ab}	37,47 ^{ab}	49,07 ^{a}	5,04	0,04
24	42 ^{b}	57,59 ^{a}	55,48 ^{a}	67,27 ^{a}	3,64	<0,01
Объем газа, мл						
0	2,78	2,83	2,84	2,96	0,50	0,99
3	9,72	10,47	10,83	13,19	0,80	0,07
7	19,5	21,12	21,83	28,76	1,52	0,01
9	30,74^{b}	37,62^{b}	32,06^{b}	48,37^{a}	2,40	<0,01
12	47,87^{c}	59,98^{b}	50,30^{c}	75,11^{a}	2,60	<0,01
24	75,49^{c}	102,68^{b}	79,45^{c}	121,87^{a}	3,37	<0,01

Таблица 9.1. 4. Эффекты FvGA и протеазы (P14L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. $^{a–c}$ Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются (P < 0,05)

Время, ч.	Контроль	FvGA	P14L	Комбинация	SE	P-значение
Перевариваемость сухого вещества, %						
0	7,2	7,09	9,97	9,10	2,54	0,81
3	11,95	15,17	22,22	24,28	4,13	0,20
7	13,48	16,47	19,35	21,36	2,55	0,22
9	16,07 ^{c}	22,74 ^{b}	28,81 ^{ab}	31,01 ^{a}	1,99	<0,01
12	23,63	29,42	37,47	37,42	5,0	0,17
24	42	44,89	55,49	56,47	3,74	0,06
Объем газа, мл						
0	2,79	2,99	2,84	3,03	0,46	0,98
3	9,72	10,54	10,82	11,93	0,64	0,19
7	19,5^{b}	21,77^{ab}	21,82^{ab}	25,42^{a}	1,22	0,05
9	30,75^{b}	35,77^{ab}	32,05^{b}	41,47^{a}	2,09	0,03
12	47,87^{b}	54,39^{b}	50,30^{b}	62,26^{a}	2,21	<0,01
24	75,49^{b}	85,68^{b}	79,45^{b}	96,57^{a}	3,19	<0,01

Таблица 9.2. 1 Эффекты CS4 и протеазы (P7L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. $^{a–c}$ Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются (P < 0,05)

Время, ч.	Контроль	CS4	P7L	Комбинация	SE	P-значение
			Перевариваемость сухого вещества, %			
0	9,21[b]	10,8[a]	12,6[a]	13,7[a]	0,77	<0,01
3	14,7[d]	17,8[c]	24,2[b]	31,1[a]	1,01	<0,01
7	25,0[c]	29,7[b]	40,2[a]	43,1[a]	1,43	<0,01
9	30,3[d]	36,0[c]	44,7[b]	48,5[a]	1,37	<0,01
12	31,9[c]	40,2[b]	43,8[b]	49,5[a]	1,86	<0,01
24	52,5[b]	56,8[b]	57,7[ab]	62,4[a]	1,83	<0,01
			Объем газа, мл			
0	2,98	3,64	3,24	3,39	0,23	0,23
3	6,50[b]	6,45[b]	8,84[a]	9,11[a]	0,54	<0,01
7	11,27[d]	13,31[c]	14,50[b]	17,19[a]	0,34	<0,01
9	14,46[c]	20,82[b]	19,67[b]	24,35[a]	0,98	<0,01
12	13,59[c]	20,12[b]	21,02[b]	24,35[a]	0,52	<0,01
24	31,88[b]	40,45[a]	31,42[b]	43,34[a]	1,25	<0,01

Таблица 9.2. 2. Эффекты TrGA и протеазы (P7L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. [a–c] Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются (P < 0,05)

Время, ч.	Контроль	TrGA	P7L	Комбинация	SE	P-значение
			Перевариваемость сухого вещества, %			
0	9,21[c]	10,8[b]	11,1[b]	13,0[a]	0,45	<0,01
3	14,7[d]	18,0[c]	24,2[b]	30,7[a]	1,04	<0,01
7	25,0[c]	28,9[b]	40,2[a]	43,3[a]	1,33	<0,01
9	30,3[c]	36,5[c]	44,7[b]	49,6[a]	1,06	<0,01
12	31,9[c]	41,0[b]	43,8[b]	51,1[a]	1,66	<0,01
24	52,5[c]	58,8[b]	57,7[b]	65,5[a]	1,76	<0,01
			Объем газа, мл			
0	2,98	3,53	3,24	3,53	0,22	0,24
3	6,50[b]	6,82[b]	8,83[a]	10,15[a]	0,47	<0,01
7	11,27[d]	13,03[c]	14,26[b]	18,26[a]	0,47	<0,01
9	14,46[c]	22,03[ab]	19,67[b]	23,43[a]	1,13	<0,01
12	13,59[c]	20,33[b]	21,02[b]	26,34[a]	0,60	<0,01
24	31,88[c]	41,60[b]	31,42[c]	45,16[a]	1,45	<0,01

Таблица 9.2. 3. Эффекты AfuGA и протеазы (P7L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. [a–c] Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются (P < 0,05)

Время, ч.	Контроль	AfuGA	P7L	Комбинация	SE	P-значение
			Перевариваемость сухого вещества, %			
0	9,21 [b]	12,1 [a]	11,1 [a]	11,3 [a]	0,55	<0,01
3	14,7 [d]	20,1 [c]	24,2 [b]	31,7 [a]	0,92	<0,01
7	25,0 [d]	33,5 [c]	40,2 [b]	46,2 [a]	1,45	<0,01
9	30,2 [d]	38,5 [c]	44,7 [b]	50,2 [a]	1,00	<0,01
12	31,9 [c]	42,0 [b]	43,8 [b]	50,3 [a]	1,81	<0,01
24	52,5 [c]	60,4 [ab]	57,7 [bc]	63,6 [a]	1,90	<0,01
			Объем газа, мл			
0	2,98	3,85	3,24	3,24	0,25	0,12
3	6,50 [c]	8,35 [b]	8,84 [b]	10,88 [a]	0,53	<0,01
7	11,27 [c]	15,05 [b]	14,50 [b]	17,44 [a]	0,35	<0,01
9	14,46 [b]	21,94 [a]	19,67 [a]	21,86 [a]	1,18	0,02
12	13,59 [c]	22,55 [b]	21,02 [b]	25,17 [a]	0,65	<0,01
24	31,88 [b]	44,24 [a]	31,42 [b]	43,19 [a]	1,29	<0,01

Таблица 9.2. 4. Эффекты FvGA и протеазы (P7L) и их комбинации в отношении перевариваемости сухого вещества и газообразования in vitro. [a–c] Средние значения в строке с различными верхними индексами отличаются ($P < 0,05$)

Время, ч.	Контроль	FvGA	P7L	Комбинация	SE	P-значение
			Перевариваемость сухого вещества, %			
0	9,20	9,85	11,1	10,7	0,51	0,05
3	14,7[c]	18,0 [b]	24,2 [a]	25,3 [a]	1,09	<0,01
7	25,1 [b]	28,6 [b]	40,2 [a]	40,2 [a]	1,48	<0,01
9	30,3 [c]	33,7 [b]	44,7 [b]	45,9 [b]	1,10	<0,01
12	31,9[b]	34,9[b]	43,8 [a]	46,9 [a]	1,99	<0,01
24	52,5[ab]	50,2[b]	57,7 [a]	56,8 [a]	1,93	0,03
			Объем газа, мл			
0	2,98	3,64	3,24	3,8	0,35	0,35
3	6,50 [c]	8,34 [b]	8,84 [ab]	10,08 [a]	0,49	<0,01
7	11,27 [c]	13,46 [b]	14,50 [b]	15,91 [a]	0,39	<0,01
9	14,46 [b]	18,06 [a]	19,67 [a]	19,73 [a]	0,94	0,16
12	13,59 [c]	19,23 [b]	21,02 [a]	22,45 [a]	0,60	<0,01
24	31,88 [b]	33,94 [ab]	31,42 [b]	36,40 [a]	1,31	0,041

Пример 19

Гидролиз мальтозы посредством глюкоамилаз

Как правило, именно глюкоза абсорбируется у животных. Мальтоза представляет собой дисахарид, образованный из двух звеньев глюкозы. Таким образом, мальтоза нуждается в гидролизе до глюкозных мономеров для того, чтобы быть абсорбированной. Для глюкоамилазы является преимущественным наличие высокой каталитической активности в отношении субстрата, представляющего собой мальтозу, в дополнение к другим предпочтительным свойствам для применения в качестве ферментной кормовой добавки. Предпочтительно глюкоамилаза должна характеризоваться по меньшей мере 20% активностью в отношении субстрата, представляющего собой мальтозу, по сравнению с активностью TrGA в условиях тестирования, описанных в данном документе.

Активность глюкоамилазы в отношении мальтозы определяли следующим образом. Получали реакционную смесь, которая содержала 2% (вес/об.) или 8% (вес/об.) мальтозы

(M–5885, Sigma) и 10 мкг глюкоамилазы в 50 мМ Mes–NaOH (pH 6,0), содержащем 5 мМ $CaCl_2$, с конечным объемом, составляющим 0,05 мл в 96–луночном микропланшете. Каждую реакцию глюкоамилазы с мальтозой повторяли три раза.

Реакцию проводили при 40°C в течение 20 мин, которая находилась в линейном диапазоне по отношению к высвобождению глюкозы. Реакцию проводили в ПЦР–машине при 95°C в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры (23°C) 10 мкл реакционной смеси, которую разбавляли до концентрации в диапазоне от 0,5 до 0,9 мг глюкозы на мл, смешивали с 0,24 мл реагента GOPOD (набор для анализа на D–глюкозу GOPOD Format от Megazyme) в микропланшете. Смесь затем инкубировали при 50°C в течение 20 мин и показатель поглощения считывали при 510 нм. Стандарт глюкозы от изготовителя применяли для построения стандартной кривой для калибровки.

Данные в таблице 10 показывают, что все протестированные глюкоамилазы характеризовались активностью в отношении мальтозы в условиях, подобных или близких к тем условиям пищеварения, что обнаружены *in vivo*, таким как почти нейтральное значение pH, составляющее 6,0.

Было отмечено, что AnGA являлась исключением в отношении субстрата, представляющего собой мальтозу, в таких условиях тестирования. Таким образом, AnGA не является подходящей глюкоамилазой для применения, как описано в данном документе.

Таблица 10. Гидролиз мальтозы посредством четырех глюкоамилаз при двух концентрациях мальтозы и значении pH 6,0

Обработка	2% мальтоза (вес/об.)	8% мальтоза (вес/об.)
TrGA*	100	100
CS4	44	44
AfuGA	41	33
AnGA	15	12
Контроль (минус фермент)	0,2	2

*Активность TrGA в отношении мальтозы рассматривали как 100%.

(57) Формула изобретения

1. Способ увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы у жвачного животного, который включает добавление по меньшей мере одной альфа–1,4/1,6–гликозидгидролазы (GLCH), выбранной из α-амилазы из источника Aspergillus kawachii (AkAA) и α-амилазы из источника Aspergillus Clavatus (AcAA), в качестве кормовой добавки в корм для жвачного животного, где указанная гидролаза (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью гидролазы при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанная гидролаза активна в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) гидролаза действует совместно с пищеварительными ферментами, присутствующими в пищеварительных камерах жвачного животного, с обеспечением увеличения перевариваемости крахмала и выхода глюкозы.

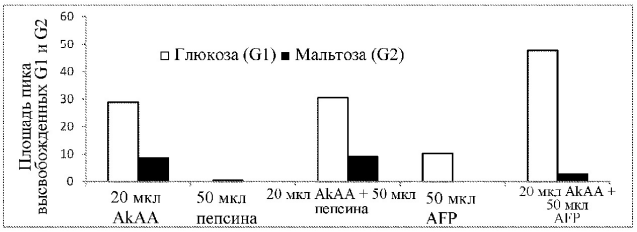
2. Способ по п.1, где по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала в условиях, сравнимых с условиями, обнаруженными в рубце или сычуге.

3. Способ увеличения перевариваемости крахмала, увеличения выхода глюкозы, увеличения переваривания сухого вещества и увеличения газообразования во время

ферментации у жвачного животного, включающий добавление в корм композиции на основе ферментов, содержащей (i) по меньшей мере один фермент GLCH, выбранный из α-амилазы из источника Aspergillus kawachii (AkAA) и α-амилазы из источника Aspergillus Clavatus (AcAA), в качестве кормовой добавки для жвачного животного, где указанный фермент (a) характеризуется по меньшей мере 20% активностью при значении pH, равном 3 или меньше, в присутствии пепсина по сравнению с активностью ферментов при значении pH 6 в присутствии пепсина, (b) указанный фермент активен в по меньшей мере двух из трех пищеварительных камер жвачного животного, включающих рубец, сычуг и тонкую кишку, и (c) фермент действует совместно с панкреатической амилазой с обеспечением увеличения выхода глюкозы, и (ii) по меньшей мере одну протеазу, выбранную из пепсина, панкреатина, бациллолизина (P7L) и термолизина (P14L).

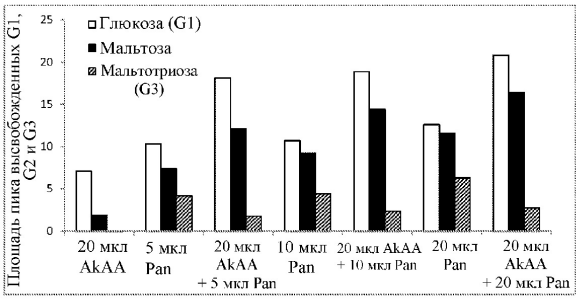
4. Способ по п.3, где по меньшей мере один фермент GLCH способен к гидролизу сырого крахмала.

1



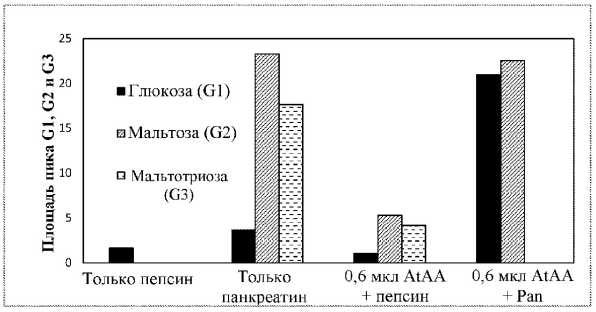
Фигура 1. Высвобождение глюкозы и мальтозы из кукурузной муки посредством альфа-амилазы AkAA в
в присутствии пепсина и AFP-протеаз при значении pH 3,2

2



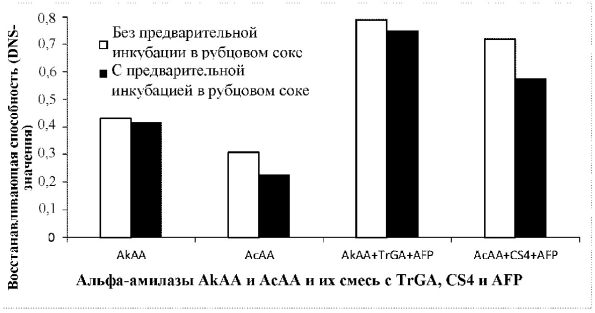
Фигура 2. Высвобождение глюкозы, мальтозы и мальтотриозы из кукурузной муки посредством альфа-амилазы AkAA и панкреатина при значении pH 6,7 и синергетический эффект AkAA с панкреатином в отношении увеличения высвобождения глюкозы и снижения высвобождения мальтотриозы

3



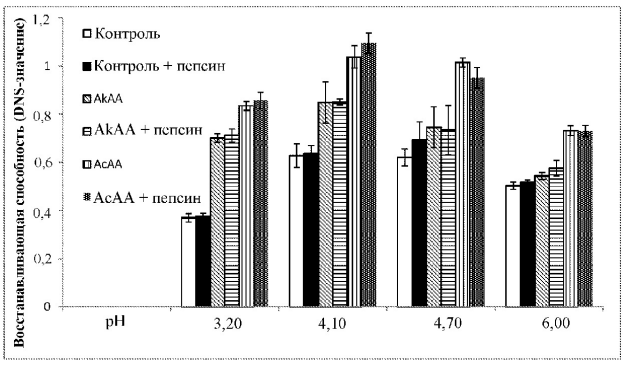
Фигура 3. Активность альфа-амилазы AtAA в отношении кукурузной муки в присутствии пепсина при значении pH 2,5 и панкреатина при значении pH 6,7 и полное превращение мальтотриозы при совместном дозировании AtAA и панкреатина

4

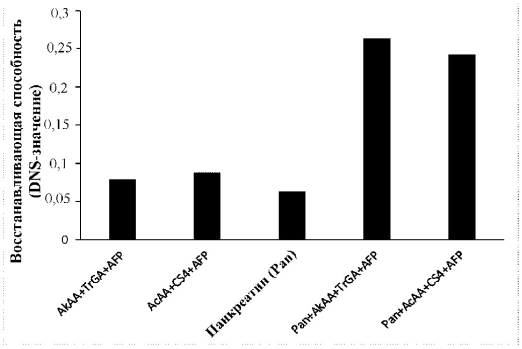


Фигура 4. Стабильность альфа-амилаз AkAA и AcAA и их смеси в присутствии глюкоамилазы (TrGA или CS4) и аспартильной протеазы (AFP) при инкубировании с рубцовым соком

5



Фигура 5. Активность альфа-амилаз AkAA и AcAA в присутствии пепсина, протестированная при значениях pH 3,2-6,0



Фигура 6. Активность смесей ферментов, содержащих альфа-амилазы AkAA или AcAA, и глюкоамилазу (TrGA или CS4), и аспартильную пептидазу (AFP), в присутствии панкреатина (Pan) при значении pH 6,0

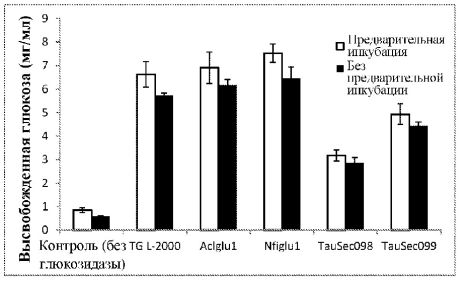
Фигура 7. Взаимодействие глюкоамилаз CS4, TrGA, Brew1, AfuGA и FvGA с панкреатином при значении pH 6,0 в отношении увеличения гидролиза гранул кукурузного крахмала

8

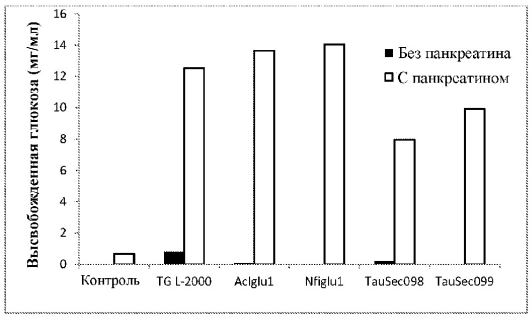
Фигура 8. Взаимодействие глюкоамилаз CS4, TrGA, Brew1, AfuGA и FvGA с панкреатином при значении pH 6,0 в отношении увеличения гидролиза гранул кукурузного крахмала

Фигура 9. Высвобождение глюкозы из гранул кукурузного крахмала посредством дрожжевой мальтазы (альфа-глюкозидазы) в присутствии фиксированного количества панкреатина при значении pH 6,0

10



Фигура 10. Стабильность пяти альфа-глюкозидаз в рубцовом соке и взаимодействие с панкреатином при высвобождении глюкозы при значении pH 6,0



Фигура 11. Высвобождение глюкозы посредством пяти альфа-глюкозидаз, инкубированных с панкреатином при значении pH 6,0