

(11) Patent numeris: **3208**

(51) Int.Cl.⁵: **A23K 1/00,**
A23K 3/00

(21) Paraiškos numeris: **IP482**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 04 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 03 27**

(31,32,33) Prioritetas: **867039, 1992 04 10, US**

(72) Išradėjas:
Markku Virkki, FI
Juha Heikki Antero Apajalahti, FI
Kalevi Juhani Visuri, FI

(73) Patent savininkas:
SSV-Development Oy, P.O.Box 390, SF-00101 Helsinki, FI

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabalienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Fermentų gaminiai, skirti skaidulinių kultūrų maistingajai vertei pagerinti ir konservuoti

(57) Referatas:

Šiame išradime aprašomas celiuliozinės medžiagos frakcionavimo būdas, gautos frakcijos ir skaidulinių kultūrų apdorojimo būdas, panaudojant šias frakcijas tiek vienas, tiek kartu su naudingais mikroorganizmais.

Šis išradimas yra susietas su skaidulinių kultūrų, kurias vartoja atrajojantys ir vienskrandžiai gyvuliai, maistingosios vertės pagerinimu, apdorojant naujais fermentiniais preparatais. Tiksliau sakant, išradimas susietas su celiulazės fermentų, gautų iš *Trichoderma* rūšies (kaip pavyzdys, bet nebūdingas), išskirstymu siekiant padidinti jų efektyvumą mikrobams paimant energiją iš celiuliozės ir hemiceliuliozės atrajotojų didžiajame skrandyje ir/arba pagerinant vienskrandžių ir atrajojančių vienskrandžių gyvulių, neturinčių fermentinės sistemos, galinčios susidoroti su skaidulomis, pašaro įsisavinimo procesą. Dar daugiau, šie nauji fermentiniai produktai gali būti panaudoti apdorojant skaidulines kultūras konservavimo metu ir pagerinant silosą, o taip pat apdorojant konservuotą derlių prieš pat šėrimą. Išradimas taip pat susietas su minėtų fermentinių gaminių paruošimo būdais.

Kai skaidulinės kultūros subręsta, energijos, gaunamos iš žemės ploto vieneto, kiekis padidėja, bet metabolinė energija, t. y. celiuliozės ir hemiceliuliozės kiekis sumažėja dėl augalų sumedėjimo, kurio metu celiuliozė, esanti augalų ląstelių sienelėse, sumedėja dėka sudėtingų skersinių ryšių. Dėl to gyvuliai žymiai prasčiau įsisavina sausus komponentus. Todėl, nežiūrint į tai, kad ekonominiu požiūriu derlius turi būti nuimtas subrendęs, kai yra didžiausia sausų medžiagų išeiga, energijos įsisavinimo apribojimas priverčia nuimti derlių dar nepakankamai subrendusį su mažesne sausų medžiagų išeiga. Dėl mažo sausų medžiagų kiekio iškyla problemos konservuojant. Suardant fermentais tuos skersinius ryšius tarp celiuliozės elementų, galima nuimti ir labiau subrendusį derlių, padidinant išeigą ir nepamažinant, kaip paprastai būna, įsisavinimo galimybės. To paties proceso metu gali atsirasti cukrus, kurį gali naudoti siloso mikrobai, tuo pagerinant tokio derliaus konservavimą.

nepalankiomis oro sąlygomis, kai sausų medžiagų kiekis yra mažas.

Konservavimas

5 Skaidulinių kultūrų (žolės, ankštinių augalų, visų javų - kukurūzų, sorgo ir t. t.) išsaugojimas vėlesniam panaudojimui šeriant iš esmės priklauso nuo vandens pašalinimo džiovinant (šienas ir panašūs dalykai) arba
10 nuo sudarymo kliūčių orui patekti ir apsaugojimo masės rūgimo toje vietoje, kur epifitinių ardančių mikroorganizmų (mielių, pelėsių ir bakterijų) veikla yra kontroliuojama, augalų medžiagos fermentų veikla apribota. Praktiškai reikalingas pH mažesnis kaip 4,2
15 yra gaunamas pridedant rūgštis į derlių arba dėka rūgštis, kurią pagamina epifitiniai mikroorganizmai fermentavimo metu.

Pastarosios nuostatos dėl aplinkos apsaugos riboja
20 rūgščių panaudojimą. Šias aplinkosaugos nuostatas stiprina tokios plačiai naudojamos rūgštys kaip skruzdžių rūgštis. Šios rūgštys padidina rūgštis išsiskyrimą iš drėgno derliaus.

25 Alternatyva yra susieta su natūralia fermentacija. Tačiau natūrali fermentacija būna įvairi ir kartais nepatenkinama. Pavyzdžiui, derliuje, kuriame yra cukraus substratų, gali vyrauti nereikalingi epifitai ir gali trūkti reikalingų pieno rūgštis bakterijų.
30 Būtinios pieno rūgštis bakterijos, t. y. homopieno bakterijos, iš esmės gamina pieno rūgštį. Ši pieno rūgštis gamyba sumažina pH, nesumažinant bent kiek žymiau maistingosios vertės, ypač proteino kokybės. Priešingu atveju, kai vyrauja epifidai, pH sumažinamas
35 labai nežymiai ir gali nepasiekti pakankamai žemos vertės. Tai daro įtaką maistingosioms savybėms ir tuo pačiu gyvulių sugebėjimui išsisavinti medžiagas.

Šią situaciją galima pagerinti pridedant tiek būtinų pieno rūgšties bakterijų į derlių, kad jos vyrautų prieš epifitus. Bet šis metodas nepadeda, kai derliuje
5 yra mažai cukraus. Galima pridėti vandenyje tirpstančių angliavandenių, kurių reikia pieno rūgšties bakterijoms. Pavyzdžiui, galima pridėti melasos, krakmolo ar cukraus, tokio kaip gliukozė, laktozė ar sacharozė. Tačiau dėl to iškyla kitos problemos. Bendru atveju
10 reikia dėti daug cukraus, t. y. 10-20 kilogramų cukraus tonai derliaus arba tarp 35 ir 45 kilogramų melasos tonai derliaus. Labai sunku tokį didelį kiekį klampios medžiagos įterpti į derlių. Taip pat sunku tolygiai įterpti sausas medžiagas. Kai kurie priedai, tokie kaip
15 gliukozė, laktozė ir sacharozė yra per brangios vartoti tokiu būdu. Be to, pieno rūgšties bakterijos efektyviai nenaudoja krakmolo, nebent yra tam tikras kiekis amilazės, kuri verčia krakmolą į cukrų.

20 Sudėtingiems angliavandeniams derliuje skaidyti į paprastą cukrų kaip alternatyvą galima naudoti fermentus. Pieno rūgšties bakterijos gali naudoti tokiu būdu gautą cukrų ir gali vyrauti fermentacija. JAV patente Nr. 4 751 089 (autoriai Heikonen ir kiti) yra
25 siūlomas metodas, kaip silosuoti pašarus ir grūdus, pridedant gliukozės oksidazės. Gliukozės oksidazė gamina gliukoninę rūgštį iš gliukozės tirpiuose angliavandenyuose. Gliukoninės rūgšties kaupimas mažina pH. Pagal minėtą JAV patentą kiti fermentai, tokie kaip
30 celiulazė, hemiceliulazė ir B-gliukozidazė gali būti pridėti tikslu padidinti gliukozės gamybą.

Lašelieną ardančių fermentų panaudojimas tikslu apsaugoti ir padidinti silosuoto pašaro maistingąsias
35 vertybes ir pagerinti apdoroto pašaro skonį, įsisavinimą bei virškinimo spartą taip pat buvo aprašytas JAV paraiškoje Nr. 510 506, pateiktoje 1990 m.

balandžio 18 d. Fermentinė sudėtis, aprašyta šioje paraiškoje, apima bent vieną fermentą iš grupės, susidedančios iš pektinazės, celiulazės, ksilazės, amilazės, arabinozidazės, kutinazės, lipazės ir esterazės ir gali būti naudojama kartu su homopieno bakterijomis.

Tačiau ląstelieną ardantys fermentai gali sukelti nepageidautinus šalutinius reiškinius, kai jie yra įdedami į skaidulines kultūras, kuriose yra mažai (t. y. mažiau kaip 25%) sausų medžiagų, būtent nesubrendusiame derliuje. Pavyzdžiui, ląstelieną ardantys fermentai gali padidinti ištekančių medžiagų tėkmę. Ištekančiose medžiagose yra tirpios ląstelinės medžiagos. Dėl šių medžiagų ištekančioms medžiagoms būdingas didelis BOD (biocheminis deguonies poreikis), o tai gali sukelti gamtosaugos problemas. Be to, ištekančių medžiagų praradimas sumažina derliaus maistingąsias vertybes. Šie fermentai taip pat gali padidinti pieno rūgšties vertę ir taip pakeisti skaidulinę struktūrą, kad net sumažina gyvulių galimybę išsisavinti. Be to, dėl padidėjusio cukraus kiekio, kurį pagamina fermentai, gali geriau augti mielės ir pelėsiai. Padidėjęs mielių ir pelėsių augimas gali sumažinti aerobinį stabilumą ir pagaminti pavojingus mikotoksinus.

Efektyvumas, su kuriuo gyvuliai išsisavina skaidulas, priklauso nuo mikrobo populiacijos mišinio didžiajame skrandyje. Mikrobo populiacijos sudėtis priklauso nuo pašaro. Galutinių mikrobo poveikio energijos šaltiniams rezultatu yra lakių riebiųjų rūgščių gamyba, kurios veikia kaip pirmtakas gyvulio audiniuose tiekiant energiją metaboliniams procesams ir sintezuojant gyvulinius produktus, t. y. pieną, mėsą ir vilną. Šių produktų gamybos efektyvumas priklauso nuo lakių

riebiųjų rūgščių proporcijų, ypatingai acto, propano ir butano rūgščių.

Pašarai, kuriuose yra daug krakmolo ir/arba cukraus
 5 skatina butano ir propano rūgščių sintezę, o skaidulos
 skatina acto rūgšties sintezę. Reikalingas didžiojo
 skrandžio fermentacijos tipas priklauso nuo gyvulio
 gaminamo produkto. Todėl galimybė keisti maitinančiąją
 terpę ekonomine prasme yra pirmo svarbumo dalykas, ypač
 10 galimybė keisti šiuo aspektu skaidulų reaktyvumą,
 kadangi tai yra pati pigiausia energijos forma.

Vienskrandžiams gyvuliams skaidulos nėra gatavas
 energijos šaltinis, bet jos yra daugelyje krakmolo
 15 šaltinių, t. y. grūdų. Skaidulos taip pat yra labai
 svarbios, palaikant normalią žarnyno veiklą. Tai susiję
 su skaidulų reaktyvumu, t. y. katijonų apykaitos geba.
 Galimybė išlaisvinti energiją iš maisto skaidulinių
 frakcijų ir pagerinti jo reaktyvumą yra labai svarbus
 20 dalykas, susijęs su vienskrandžių gyvulių šėrimu ir jų
 sveikata.

Fermentiniai produktai, skirti pašarui su mažu kiekiu
 sausų medžiagų išsaugoti ir pašaro įsisavinimui
 25 pagerinti iškelia dvi pagrindines problemas. Visų
 pirma, efektyviame silosavimo procese fermentai turi
 užtikrinti reikalingą pH, pieno rūgšties ir angliavandenių
 koncentracijas ir tuo pačiu mažinti
 ištekėjimą.

30

Pašaro apdorojimas pilnu ląstelieną ardančių fermentų
 mišiniu sumažina skaidulų kiekį silose tirpdant
 polimerinius angliavandenius. Dėl ypač efektyvaus
 įsisavinimo visos ląstelių sienelės suyra ir dėl to
 35 išteka visos medžiagos su dideliu cukraus kiekiu.
 Silosavimo metu stimuliuojamas fermentavimas, kaupiasi
 pieno rūgštis ir pH. Tokiomis sąlygomis bakterijos

nuslopintos, bet fermentai toliau gamina monomerinius angliavandenius, kurių dalis gali būti prarasta su ištekančiomis medžiagomis. Silosas, kuriame yra didelė pieno rūgšties koncentracija ir lengvai fermentuojamas cukrus, gali būti pavojingas atrajojantiems gyvuliams, kadangi gali sukelti pieno rūgšties acidozę ir medžiagų įsisavinimo sutrikimus.

Antra, norint užtikrinti efektyvų atrajojančių gyvulių didžiojo skrandžio darbą ir pašaro vartojimą, cukraus kiekis, prieinamas didžiojo skrandžio mikrobams ir skaidulų reaktyvumas turi būti optimizuoti.

Šio išradimo tikslas - užtikrinti tokių fermentų paruošimą įvairioms kultūroms, subrendimo laipsniams ir sausų medžiagų kiekiams, kuris neturėtų trūkumų, būdingų žinomiems paruošimo būdams. Jeigu kalbėti tiksliau, tai šio išradimo tikslas - užtikrinti tokias fermentų kombinacijas, kurios naudingai pakeistų augalų ląstelių struktūrą, užtikrintų tiksliai silosavimui reikalingą kiekį; nepadidintų ištekėjimo; neskatinant miltelių arba pelėsių augimo; bet galėtų taip pakeisti augalų polimerų struktūrą, kad jie pasidarytų labiau pasiduodantys tolimesnei hidrolizei didžiajame skrandyje ir juos būtų galima lengviau įsisavinti vienskrandžiame virškinimo trakte.

Kitas šio išradimo tikslas - sukurti minėtų fermentinių produktų paruošimo būdus.

Su nuostaba aptikta, kad komercinių produktų žalingą efektą lemia tam tikros fermentų kombinacijos, esančios komercinės rūšies celiulazėse, naudojamose minėtuose produktuose. Išskiriant minėtus komercinius fermentus, pagal šį išradimą gaunami nauji fermentiniai produktai, kurių kiekviename yra keletas skirtingų fermentų ir

turi skirtingas savybes, pagal kurias galima atskirti kiekvienam atskiram tikslui tinkančias frakcijas.

Atskyrimo metodai, taikomi pagal šį išradimą, apima tuos metodus, kurie atskiria komercinės celiulazės dalis pagal proteinų jonų mainų savybes. Pavyzdžiui, yra naudingi chromatografiniai metodai, tokie kaip jonų mainų chromatografija. Naudingose dervose yra Q-Sefarozės ir Mono-Q (abi iš *Pharmacia*).

Celiulazės frakcijos įvairiomis kombinacijomis yra naudingos apsaugant skaidulinius pašarus ir pagerinant jų išsisavinimą, kai jais šeriami atrajojantys ir vienskrandžiai gyvuliai. Kiekviena celiulazinė frakcija turi būdingą jai fermentų rinkinį ir todėl skirtingai veikia skaidulinį derlių silosavimo metu ir taip pat skirtingai veikia didžiajame skrandyje ir plonosiose žarnose, kai suėdamas pašaras. Frakcijos gali būti naudojamos po vieną arba kelios iš karto ir/arba su atitinkamais naudingais mikroorganizmais, tokiais kaip mielių bakterijos. Jų parinkimas priklauso nuo reikalingo rezultato kiekvienu konkrečiu atveju. Šie produktai taip pat gali būti naudojami konservuotam pašarui prieš pat šėrimą.

25

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1. Eliuato, gauto iš komercinės celiulazės anijonitinėje kolonėlėje, sugertis ties 280 nm.

30

Fig.2. Proteinų komercinėje celiulazėje ir visose keturiose pagrindinėse frakcijose, gautose anijonitiniu chromatografiniu būdu, izoelektriniai taškai.

35

Fig.3. Eliuato, gauto iš komercinės celiulazės, ir pastarosios keturių pagrindinių anijonitinių

frakcijų, gautų Mono-Q analitinėje anijonitinėje kolonėlėje, sugertis ties 280 nm.

5 Fig.4. Eliuato, gauto iš komercinės celiulazės frakcijos A CM-Sefarozės (Pharmacia) katijonitinėje kolonėlėje, sugertis ties 280 nm.

10 Komercinės rūšies ląstelieną ardančių fermentų mišiniuose (tokiuose, kaip pardavinėjami su prekiniu pavadinimu Cytolase-123 iš Genencor) paprastai yra daug įvairių fermentų. Ląstelieną ardančių fermentų, turinčių komercinę vertę, mišiniai gaminami iš *Trichoderma* rūšies, pavyzdžiui *Trichoderma longibrachiatum*. Kiti ląstelieną ardančių fermentų mišiniai, gaunami iš 15 bakterinių ar kitų grybinių šaltinių, turi panašias savybes.

20 Fermentų frakcijų poveikis (naudojant jas po vieną ar kelias iš karto) pašarui, silosui bei gyvuliams buvo nustatytas matuojant didelį kiekį parametrų. Svarbiausi parametrai, susieti su gyvuliais, yra išlaisvinto cukraus kiekis ir jo rūšys bei skaidulų struktūros pakitimai. Tai reguliuoja didžiojo skrandžio fermentacijos procesą ir pašaro įsisavinimą vienskrandžiame 25 trakte. Matuojant skaidulų sugebėjimą išlaisvinti cukrų prieš ir po silosavimo, galima nustatyti pašaro vertės praradimą saugojimo metu. Jeigu struktūrizuotų angliavandenių didžioji dalis paverčiama į rūgštį silosavimo metu, tai konservavimas geras. Iš kitos 30 pusės, tai sumažina energiją, prieinamą didžiojo skrandžio mikrobams, ir todėl sumažina maistingąją vertę. Optimali kombinacija turėtų būti tokia, kuri išlaisvina pakankamai cukraus, kad būtų užtikrintas geras silosavimas, ir tik pagerina didžiojo skrandžio 35 veiklą. Svarbia charakteristika taip pat yra medžiagų ištekėjimo skatinimas, kuris susijęs su cukraus išlaisvinimo aktyvumu.

Kiekvienoje gautoje fermentų frakcijoje yra būdingas atskirų fermentų rinkinys, ir tos frakcijos skirtingai veikia skaidulinę struktūrą, skirtingai išlaisvina
5 cukrų, skirtingai konservuoja silosą ir sukelia skirtingą ištekėjimą.

Remiantis minėtomis savybėmis, galima pasirinkti tinkamiausią frakciją kiekvienam konkrečiam tikslui.
10 Derliui konservuoti turėtų būti pasirinktos frakcijos, kurios per 48 valandas padaro pH apie 4,0 ir sudaro tokią likusio cukraus kiekį, kuris palaiko *lactobacilae* komponentą. Pasirinktos frakcijos taip pat gali būti panaudotos tikslu pagerinti šviežio ar konservuoto
15 skaidulinio derliaus maistingąją vertę prieš šėrimą. Medžiagų ištekėjimo problemą galima išspręsti pašalinant tas frakcijas, kurios skatina per didelį cukraus išsiskyrimą.

20 Silosuojant skaidulines kultūras, kurios turi mažai sausų medžiagų, tikslinga naudoti fermentų frakcijas B arba C, po vieną arba kartu, kadangi jos užtikrina reikiamą cukraus kiekį, kad gerai vyktų siloso fermentacija, nepadidinant medžiagų ištekėjimo. Frakcija
25 A, nors ir truputį padidina medžiagų ištekėjimą, tačiau padidina ir cukraus grandinėlių laisvų galų skaičių ir padaro skaidulas palankias tolimesnei fermentinei hidrolizei, kurią atlieka didžiojo skrandžio mikro-organizmai, o taip pat lengvesniam įsisavinimui
30 vienskrandžiame trakte. Frakcija A, viena arba su B, su C arba su B ir su C pagerina didžiojo skrandžio priėjimą prie cukraus. Frakcija A taip pat pagerina skaidulų reaktyvumą, kai naudojama viena arba su B, su C arba su B ir C. Tokiu būdu, nors frakcijoms B, C arba
35 BC taikoma pirmenybė konservuojant derlių su mažu sausų medžiagų kiekiu, kadangi nesukelia medžiagų ištekėjimo,

tačiau, pridėjus frakcijos A, pagerėja skaidulų reaktyvumas ir maistingosios vertybės.

5 Tais atvejais, kai medžiagų ištekejimas nesudaro
 10 problemos, t. y. silosuojamos skaidulinės kultūros turi
 sausų medžiagų virš 25%, galima naudoti vien tik
 frakciją A arba kartu su B, su C arba su B ir C, kai
 norima pagerinti derliaus išsaugojimą ir gyvulių
 sugebėjimą įsisavinti pašarus. Šios frakcijos
 15 kombinacijos taip pat gali būti naudojamos šviežių ar
 konservuotų skaidulinių kultūrų, apdorotų prieš šėrimą,
 maistingajai vertei ir stabilumui pagerinti.

15 Jeigu derlius turi mažai sausų medžiagų, tai medžiagų
 ištekejimo problemą galima išspręsti pašalinant
 frakcijas A ir D. Dėl frakcijos D iš esmės žalingai
 išteka medžiagos. Frakcija D taip pat neigiamai veikia
 cukraus išlaisvinimą. Jos dėka per daug angliavandenių
 paverčiama cukrumi. Be to, frakcija D žymiai sumažina
 20 skaidulų aktyvumą.

Kai reikalinga staigiai padidinti cukraus išlaisvinimą,
 pavyzdžiui prieš gyvulių šėrimą, pirmenybė teikiama
 frakcijai D ir kombinacijoms su ja. Tai reikalinga
 25 atrajojantiems ir ypatingai vienskrandžiams gyvuliams.

Fermentiniai produktai pagal šį išradimą turi keletą
 pranašumų. Naudojant tinkamas fermentų frakcijas,
 pavieniui arba tinkamomis kombinacijomis (kartu su
 30 egzogeniniais mikroorganizmais ar be jų), žymiai
 geriau išsaugomos skaidulinės kultūros ir gyvuliai
 geriau įsisavina pašarus. Ypatingai verta pabrėžti
 keturis dalykus: pagerinamas derliaus konservavimas,
 galima išspręsti medžiagų ištekejimo problemą, gali
 35 būti pagerintas cukraus išlaisvinimas ir gali būti
 pagerinta skaidulų reaktyvumo vertė. Tai pasiekama,
 naudojant fermentinius produktus pagal šį išradimą.

1 pavyzdys. Citolazės - 123 frakcija

Frakcionavimas atliktas 2 litrų Pharmacia Q-Sefarozės anijonito kolonėlėje. Kiekvienam ciklui 1 litras
 5 citolazės-123 (Genencor), kurioje yra apie 200 g proteino (pagal sugertį ties 280 nm) su pH 5,2, buvo pakeistas iki pH 8 ir iki laidumo 20 nM tris-buferio. Tai padaryta ultrafiltracijos būdu, o po to atskiedžiant vandeniu. Toks fermentų tirpalas supiltas
 10 į kolonėlę. Nesugerta medžiaga (frakcija A) buvo išplauta su maždaug 10 litrų 20 mM tris-buferiu. Sugertieji fermentai buvo išskirti, naudojant NaCl su tiesiniu gradientu 0-0,5 M, kurio bendras tūris apie 10 litrų. Kolonėlės eliuentas buvo surinktas. Surištos
 15 frakcijos buvo išskirtos, naudojant 20 mM tris-buferį, esant natrio chlorido koncentracijoms 80 mM (frakcija B), 150 mM (frakcija C) ir 500 mM (frakcija D). (Čia ir žemiau frakcijos vadinamos A, B, C ir D jų išskyrimo tvarka.) Frakcionavimo rezultatai parodyti grafiškai
 20 fig.1.

Frakcijose A, B, C ir D yra tokie proteino kiekiai (nustatyta pagal sugertį ties 280 nm):

A 27 g	B 18,3 g	C 47,6 g	D 73 g
--------	----------	----------	--------

25

Manoma, kad frakcijos D uodegoje (t. y. išskyrimas 0,3 M NaCl ir aukštesniame lygyje) proteino yra tiktai pėdsakai, o uodegoje stebimą sugėrimą lėmė mažo molekulinio svorio W sugeriančioji medžiaga.

30

Frakcijos buvo ištirtos, naudojant izoelektrinį fokusavimą geliuose siekiant atskirti proteinus turinčius izoelektrinį tašką tarp 3 ir 9. Šie rezultatai buvo panaudoti kaip pirštų atspaudai,
 35 siekiant palyginti frakcijas, gaunamas iš skirtingų atskyrimo stadijų. Gauti rezultatai parodyti grafiškai

fig.1. Svarbiausios frakcijos taip pat buvo tiriamos analitine skystine chromatografija, naudojant Mono-Q, ir tai leido puikiai skiriamąją gebą. Rezultatas grafiškai pavaizduotas fig.3.

5

Medžiaga, kuri buvo neabsorbuota Q-sefarozeje (frakcija A), buvo frakcionuota, naudojant katijonitinę CM-Sefarozės kolonėlę. Rezultatai parodyti fig.4. Citolazė buvo padalinta į 4 frakcijas, naudojant Q-Sefarozę. Kiekvienoje iš šių frakcijų yra keletas skirtingų proteinų ir fermentų. Citolazės ir keturių frakcijų įvairaus aktyvumo pasiskirstymas parodytas 1 lentelėje. Matyti, kad citolazė-123 yra labai sudėtingas fermentų mišinys ir kad net aptiktos frakcijos yra daugiafermentės. Vėliau, jeigu reikia, frakcijos gali būti išvalytos, pavyzdžiui chromatografiniu būdu ar nusodinant.

10

15

20

25

30

Kitu būdu fermentai gali būti išskirti, naudojant besiskiriančias pH kombinacijas, druskos koncentracijas ir buferių koncentracijas bei tipus. Pavyzdžiui naudojant 20 mM tris-buferį, kai pH yra 7,6, daugiau yra išskiriama į kolonėlę surištų frakcijų B, C ir D, negu naudojant 20 mM druskos tirpalą frakcijai B, 115 mM - frakcijai C ir 500 mM - frakcijai D. Tačiau šių parametrų pakitimas nepakeičia tvarkos, kuria frakcijos išsiskiria iš kolonėlės po to, kai frakcija A buvo išplauta. Alternatyvios procedūros metu fermentai gali būti išskirti, palaipsniui keičiant pH, buferio ir druskos koncentracijas.

35

Nefrakcionuota citolazė ir frakcijos A, B, C ir D buvo ištirtos analitine skystine chromatografija, naudojant Mono-Q kolonėlę (Pharmacia). Iš rezultatų matyti, kad frakcijos B, C ir D sudarytos iš daugiau kaip vieno komponento. Žiūrėkite fig.3.

Celobiohidrolazė I, celobiohidrolazė II ir endogliukonazė I buvo identifikuotos, naudojant anti-celobiohidrolazės I, anti-celobiohidrolazės II ir anti-endogliukonazės I atiserumą (žr. 1 lentelę).

5

Medžiaga, kuri nebuvo sugerta Q-Sefarozėje (frakcija A), buvo frakcionuota katijonitinėje CM-Sefarozės kolonėlėje. Q-Sefarozės frakcijos A frakcionavimas CM-Sefarozėje parodė, remiantis fermentų aktyvumo analize, kad medžiaga, kuri išsisikiria ties taškais 4,1 ir 4,2, turi eksterazės aktyvumą; medžiaga, kuri išsiskiria ties taškais 4,3, 4,4 ir 4,5, turi CMC; medžiaga, kuri išsiskiria ties taškais 4,4 ir 4,5, taip pat turi ksilosidazės aktyvumą; medžiaga, kuri išsiskiria maždaug ties tašku 4,4 turi arabinozidazės aktyvumą; medžiaga, kuri išsiskiria ties tašku 4,6, turi gliukozidazės (celobiozė) aktyvumą; medžiaga, kuri išsiskiria ties tašku 4,7, turi ksilanazės aktyvumą.

20

1 lentelė.

Citolazės ir frakcijų fermentinis aktyvumas*

Frakcija, ml	FPU**	CMC**	Celobinazė	Ksilanazė	Arabinozidazė	Ksilozidazė	Esterazė
CITOLAZĖ	81,2	5231	71	1559	8.6	2.4	0.26
A***	9,6	285	64	780	7.5	0.4	0.03
B*** CBH II*	1,7	15	0.1	2	0	0	0.06
C*** EG I*	4,4	633	0.7	181	0	0.9	0.03
D*** CBH I*	9,3	121	0.1	28	0	0.2	0.05

*FPU=Filtruojančiojo Popieriaus Vienetai - išlaisvina 1 mikromolį redukuojančiojo cukraus iš

25

50 mg vatmano Nr. 1 per 1 minutę, esant 50°C, pH 4,8 ir reakcijos tūriui 2 ml.

5 CMC=Karboksimetilceliuliozės vienetai - išlaisvina 1 mikromolį redukuojančiojo cukraus iš 10 mg karboksimetilceliuliozės per 1 minutę, esant 50°C, pH 4,8 ir reakcijos tūriui 2 ml.

10 Celobiozės vienetas - išlaisvina 1 nanomolį gliukozės per sekundę iš 1,8 mikromolio 4-nitrofenil-β-gliukopiranozido, esant 50°C, pH 4,8 ir reakcijos tūriui 2 ml.

15 Ksilanazės vienetas - išlaisvina 1 mikromolį redukuojančiojo cukraus iš 10 mg ksilano per 1 minutę, esant 50°C, pH 4,2 ir reakcijos tūriui 2 ml.

20 Arabinozidazės vienetas - išlaisvina 1 nanomolį p-nitrofenolio per sekundę iš 3,6 mikromolio p-nitrofenil-α-L-arabinofuranozido, esant 50°C, pH 4,0 ir reakcijos tūriui 2 ml. Ksilozidazės vienetas - išlaisvina 1 nanomolį p-nitrofenolio per sekundę iš 3,6 mikromolio p-nitrofenil-β-D-ksilopiranozido, esant 40°C, pH 5,0 ir reakcijos tūriui 2 ml.

30 Esterazės vienetas - išlaisvina 1 nanomolį p-nitrofenolio per sekundę iš 1,8 mikromolio p-nitrofenilo acetato, esant 50°C, pH 4,8 ir reakcijos tūriui 2 ml.

35 ** CBHI yra celobiohidrolazė I, CBHII yra celobiohidrolazė II, EGI yra endoglikanazė I, kaip nustatyta su antiserumu.

*** Frakcijos A, B, C ir D buvo tiriamos, esant jų koncentracijoms proporcingoms pradinėje citolazėje.

5 **2 pavyzdys. Fermentinių frakcijų, pagamintų iš citolazės-123, įtaka siloso skaidulinei struktūrai ir cheminei sudėčiai**

10 Tetraploidinė svidrė (trešimas 120 kilogramų azoto į hektarą) buvo rankomis nupjauta, naudojant sterilius būdus, transportuojama atšaldyta ir eksperimentas pradėtas praėjus 5 valandoms po nupjovimo. Sausų medžiagų buvo 13% svorio. Žolė buvo sukarpyta žirklėmis į 1 cm gabaliukus ir sudėta į plastmasinius maišelius
15 po 80 g šviežios žolės į kiekvieną. Vienodi bandiniai buvo apdoroti visomis Citolazės-123 frakcijų A, B, C ir D kombinacijomis. Po apdorojimo fermentais žolė po 25 g buvo sudėta į 160 ml serumo butelius, į kuriuos 5 minutes leistos anaerobinės dujos. Po to buteliai buvo
20 užkimšti butilo guminiais kamščiais. Buteliai buvo laikomi 30°C temperatūroje 6 savaites, ir po to išskirtos neutralaus detergento skaidulos (NDF):

Į butelius su apdorota žole pripilta 75 ml vandens,
25 buteliai 1 valandą kambario temperatūroje purtomi, o po to jų turinys nufiltruojamas per stiklo filtrą. Filtratas buvo naudojamas įvairiems tyrimams, o nuosėdos toliau išskiriamos. Nuosėdų ekstrahavimas neutraliu detergentu vykdomas tokiu būdu: i) nuosėdos
30 buvo kiekybiškai suspenduotos 100 ml tirpale (pH 7), kurio 1 litre buvo 19,6 g Titriplekso III, 3,6 g Na₂B₄O₇, 4,6 g Na₂HPO₄, 30 g natrio dodecilsulfato ir 10 ml etilenglikolmonoetileterio, ir 40 minučių plakamas, esant 60°C temperatūrai; ii) ekstrakto temperatūra buvo
35 staigiai pakelta iki 75°C ir jis karštas filtruojamas per stiklo filtrą; iii) tada nuosėdos išplautos 10 ml vandens purtant 15 minučių 60°C temperatūroje, o po to

temperatūra staigiai pakelta iki 75°C ir suspensija nufiltruota; ši vandens procedūra pakartota; iv) po to nuosėdos buvo išskiriamos, naudojant 100 ml druskos tirpalą, kurio litre buvo 3,64 g KNO_3 , 1,76 g KCl , 0,17 g NaNO_3 , 1,92 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ir 1,96 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; v) kai temperatūra nukrito nuo 60 iki 40°C , suspensija buvo nufiltruota; vi) vandens procedūra (punktas iii) pakartota 2 kartus; vii) nuosėdos buvo ekstrahuojamos 75 mililitrais acetono 15 min ir nufiltruotos; tai pakartota 4 kartus; viii) gauta NDF buvo per naktį džiovinama ant stiklo filtro, sujungta su vakuumu.

Fermentinių frakcijų poveikis tirpioms siloso dalims

D- ir L- pieno rūgštys buvo išanalizuotos, Boehringer ir Mannheim GmbH fermentinio tyrimo įrenginiu ir tai atlikta pagal gamintojo siūlomą metodiką. Amonis buvo tiriamas iš pašarmintų bandinių, naudojant specifinį elektrodą amoniui.

Tirpus proteinas buvo tirtas Lowry metodu. Tirpūs cukrūs buvo tiriami kaip trimetilsililo dariniai GLC DSCh metodu, naudojant kapiliarinę kolonėlę ir temperatūros programą. Buvo panaudotas vidinio etalono būdas su dviem vidiniais etalonais (eritritolio ir fenil-B-D-glikopiranozido).

Rezultatai apibendrinti ir pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė.

Fermentinių frakcijų (pavienių ir įvairių jų kombinacijų) įtaka tirpaus siloso sandarai

5

Fermentas	Likęs cukrus silose mg/g	Amonis $\mu\text{mol/g}$ (SM)*	Tirpus prote- inas mg/g (SM)	Pieno rūdštis D kaip % D+L
-	0	140	50	46
ABCD	20	119	49	48
ABC	5	110	58	51
ABD	21	119	60	54
ACD	15	156	58	51
BCD	44	151	57	45
AB	-7	154	54	48
AC	2	172	53	48
AD	22	186	57	50
BC	22	174	58	46
BD	45	147	54	55
CD	13	151	57	47
A	2	149	64	46
B	-2	172	52	49
C	0	177	51	48
D	52	179	51	46

SM* - sausa medžiaga

10 Likusio cukraus kiekis nustatytas neapdoroto kontrolinio pavyzdžio atžvilgiu; teigiamos reikšmės
15 reiškia koncentracijos padidėjimą, neigiamos - sumažėjimą. Buvo ištirti monosacharidai ir disacharidai ir jų kiekis pateiktas kaip likusio cukraus. Likusio cukraus kiekis gali atspindėti viso išlaisvinto cukraus silose dėl galimo skirtumo jį suvartojant ir/arba siloso mikroorganizmų augimo.

Silosas buvo gerai apsaugotas ir turėjo pH apie 4 ar dar mažiau ir didelę pieno rūgšties koncentraciją. Dėl pieno rūgšties formos galima pasakyti, kad fermentinis

apdorojimas neturėjo kiek nors žymesnės įtakos dviejų formų santykiui. Visais atvejais apie 50% laktato buvo D formos.

- 5 Likusio cukraus kiekis, apdorojus frakcijų ABD, BCD, AD, BC, BD ir D kombinacijomis, yra didesnis, negu tada, kai yra visos frakcijos. Fermentų frakcijų pasirinkimas turėjo aiškia įtaką gliukozės, ksilozės, fruktozės ir arabinozės liekamajai koncentracijai.
- 10 Kiekvienos iš jų koncentracija buvo susieta su kitų koncentracijomis; jeigu kurio nors apdorojimo metu gauta didžiausia gliukozės koncentracija, tai bus didžiausia ir kitų cukraus rūšių koncentracija. Pasirodė, kad frakcija D yra didžiausia cukraus
- 15 gamintoja silose. Jeigu veikia frakcija B ir kombinacija AB, tai gaunama neigiama cukraus gamyba.

- Tirpaus proteino koncentracija visuose bandymuose buvo tarp 50 ir 60 mg/g sausos žolės; siloso kokybė, apdorojus fermentais, nepablogėjo. Amonio kiekis
- 20 nekoreliuoja su jokiais fermentų frakcijomis.

2. Fermentų frakcijų įtaka skaidulinei struktūrai NDF struktūros analizė

- 25 Gauta NDF buvo pasverta ir išreikšta procentais nuo pradinės medžiagos sausų madžiagų kiekio.

- Pasidavimas fermentinei hidrolizei buvo nustatytas, atliekant NDF hidrolizę pilnu ląstelių ardančių fermentų mišiniu Citolazė-123 (50 000 HEC/g). Prieš naudojimą fermentų preparatai buvo praleisti pro Sephadex G-25 GPC kolonėlę siekiant pašalinti visus
- 30 mažo molekulinio svorio junginius, kurie gali turėti įtakos nustatant redukuojanti cukrų. 20 mg NDF buvo
- 35 idėta į mėgintuvėlį ir įpilta 9,6 ml Sorensen fosfato buferio, pH 7. Po 15 valandų inkubacinio laikotarpio

kambario temperatūroje buvo pridėta 0,4 ml fermento ir nustatyta pradinis cukraus išlaisvinimo greitis. Po vieną mililitrą bandinio buvo paimama, praėjus 0,1, 2,5 ir 5 valandoms. Kiekvienas bandinys nedelsiant buvo sumaišytas su 4 ml dinitrosalicilo rūgšties (DNS) tirpalo, kuris naudojamas redukuojančiam cukrui tirti. Šis reagentas nedelsiant nutraukia fermentinę reakciją.

Tada bandiniai 5 minutes pakaitinami verdančio vandens vonelėje, staigiai atšaldomi ledo vonelėje ir išmatuojama sugertis ties 540 nm. Rezultatai išreikšti redukuojančio cukraus, išlaisvinto per valandą iš gramo NDF, moliais.

NDF redukcinių galų kiekis buvo analizuojamas modifikuotu DNS metodu. 20 mg NDF buvo įdėta į mėgintuvėlį ir įpiltas 1 ml vandens, mišinys laikomas 1 valandą kambario temperatūroje, įpilta 4 ml DNS, mišinys 5 minutes pakaitinamas verdančio vandens vonelėje, staigiai atšaldomas ledo vonelėje, nufiltruojamas ir išmatuojama filtrato sugertis ties 540 nm. Rezultatai išreikšti moliais gramui NDF.

Reaktyvių hidroksilo grupių skaičius nustatytas, analizuojant acetilo grupių, įtrauktų į vėliau vykstantį acetilinimo procesą, skaičių. Trigubi 20 mg NDF bandiniai buvo sumaišyti su 2 ml piridino. Įpilta 200 μ l ^{14}C - acto rūgšties anhidrido (specifinis aktyvumas $1,04 \cdot 10^9$ sk.per min moliui) ir mišinys laikomas 30 min užlydytuose mėgintuvėliuose, esant 70°C temperatūrai. Filtratas pašalinamas, o nuosėdos du kartus išplaunamos 2 ml šviežiai perdistiliuoto piridino, o po to 4 kartus vandeniu, naudojant ultragarsinę vonią siekiant suintensyvinti nekovalentiškai surišto acetato išplovimą iš skaidulų. Paskutinio plovimo tirpalas tirtas radioktyvumo požiūriu ir nustatyta, kad neviršija foninio lygio. Skaidulos, į kurių molekulės

buvo įterpta acetilinė grupė, buvo 5 valandas hidrolizuotos, naudojant 2 ml 4N HCl, esant 90°C, o po to išmatuotas neutralizuoto filtrato radioktyvumas. Acetilo įterpimas išreikštas mikromoliais gramui NDF.

5

Gauti rezultatai apibendrinti 3 lentelėje.

3 lentelė.

10 Fermentinių frakcijų (pavienių ir įvairių jų kombinacijų) poveikis skaidulų struktūrai

Fermentas	NDF % SM	Redukuojantys ga- lai* $\mu\text{mol/g}$ (NDF)	Cukraus išlais- vinimo sparta* $\mu\text{mol/g}$ (NDF)h	Acetilizavimas * $\mu\text{mol/g}$ (NDF)
-	35	0	0	0
ABCD	18	-3	-144	17
ABC	24	2	45	-13
ABD	20	-3	-143	55
ACD	20	-3	-139	17
BCD	23	-6	-140	29
AB	27	2	58	-62
AC	27	2	92	-13
AD	21	-3	-121	55
BC	28	0	-49	-2
BD	25	-6	-138	116
CD	23	-6	-141	29
A	30	2	173	-62
B	32	0	-40	0
C	31	0	-53	-2
D	26	-6	-125	116

15 Kiekiai yra pateikiamo nulinio kontrolinio kiekio atžvilgiu.

SM yra sausos medžiagos.

Jeigu gaminant silosą yra naudojami fermentai, tai NDF vertės sumažėja. Apdorojimas, naudojant fermentų mišinį ABCD, sumažina NDF iki 18%, palyginus su 35%, kai silosas neapdorotas fermentais. Gautas NDF sumažėjimas mažesnis, kai nebuvo frakcijos D. Fermentų frakcija D turi didžiausią įtaką NDF tirpumui. Tada, kai frakcija D kombinuojama su kitomis frakcijomis, labai efektyviai tirpdamos skaidulos. Tuo galima paaiškinti tokį dalyką, kad, esant frakcijai D, redukuojančių galų skaičius mažėja. Manoma, kad frakcija D sistemingai ardo skaidulas ir tokiu būdu masę daro tirpia. Laisvų galų skaičius pasidaro mažesnis, negu kontrolinio fermentais neapdoroto bandinio atveju. NDF tirpumui taip pat turėjo įtakos ir frakcija A kombinacijose su frakcijomis B ir C. Frakcija A taip pat pagerina reaktyvumą, galbūt dėl redukuojančių galų skaičiaus padidinimo.

Silosavimo metu reikia taip pakeisti skaidulas, kad didžiojo skrandžio mikrobams būtų lengviau jas ardyti ir kad jos būtų reaktyvesnės vienaskrandžiame trakte. Didžiajame skrandyje skaidulų pirmiausiai imasi ląsteles ardantys mikrobai ir jų fermentai. Fermentinio cukraus išlaisvinimo pradinis greitis buvo nustatytas kaip NDF pasidavimas minėtam ardymui. Vertės lyginamos su bandiniais, kurie neapdoroti fermentais; teigiamos vertės rodo, kad cukraus prieinamumas didžiojo skrandžio mikrobams pagerėja; neigiamos vertės rodo, kad silosavimo metu per daug cukraus paversta į rūgštis. Matyti, kad fermentų frakcija D, viena ar kombinacijose su kitomis frakcijomis, yra mažiau tinkama silosavimui dėl didelio cukraus išlaisvinimo efektyvumo. Frakcija A turi stiprią teigiamą įtaką pradinei cukraus gamybai. Gliukozė ir celobiozė sudaro 95% išlaisvinto cukraus. Kai naudojamos frakcijos A ir D, frakcija D buvo vyraujanti. Viena frakcija A arba

kartu su B, C ar BC palengvina didžiojo skrandžio mikrobus priėjimą prie cukraus ir ta prasme naudinga.

5 NDF frakcijų acetilinimas iš fermentais apdoroto siloso parodė, kad angliavandenių pašalinimas iš ląstelės sienelių nesumažina reaktyvių hidroksilo grupių skaičiaus. Priešingai, efektyviai anglivandenių skaidantys fermentai padidino ¹⁴C-acetilo įterpimą į apdorotas skaidulas. Labiausiai tirpumą skatinančios
10 fermentų kombinacijos ir pati citolazė padidina paveiktų hidroksilo grupių skaičių. Frakcija D turėjo didžiausios įtakos hidroksilo grupių skaičiui. Galimas dalykas, kad paveiktos hidroksilo grupės buvo fenoliniai lignino pakaitalai. Pasirodė, kad frakcija C
15 yra priešinga frakcijai D. Frakcija A veikė priešinga kryptimi, negu frakcija D.

Remiantis šiuo išradimu, galima keliais būdais pakeisti netirpias siloso dalis, parenkant atitinkamas fermentų
20 kombinacijas. Didžiausias poveikis gautas panaudojant arba pašalinant, kur įmanoma, frakcijas A ir D, po vieną arba kombinacijose. Kai silosuojamas pašaras ir yra fermentų frakcija D kokioje nors kombinacijoje, susidaro netirpi frakcija, kuri vėliau negali būti
25 fermentiškai hidrolizuojama naudotu fermentų mišiniu. Frakcijos A poveikis priešingas; silosas, pagamintas naudojant frakciją A, bet nenaudojant frakcijos D, labiau pasiduoja tolimesnei fermentinei hidrolizei, negu kontrolinis fermentais neapdorotas bandinys. Nors
30 ne visos frakcijos ir frakcijų kombinacijos buvo smulkiai aptartos, akivaizdu, kad visos galimos frakcijų kombinacijos patenka į šio išradimo rėmus.

**3 pavyzdys. Fermentų frakcijų, pagamintų iš citolazės-
35 123, įtaka nedžiagų ištekėjimui ir siloso, pagaminto iš tetraploidinės svidrės, cheminei sudėčiai**

- Tetraploidinė svidrė (trešimas 120 kilogramų azoto į hektarą) buvo rankomis nupjauta, naudojant sterilius būdus, transportuojama atšaldyta ir eksperimentas pradėtas praėjus 5 valandoms po nupjovimo. Sausų medžiagų buvo 13% svorio, pH 6,35. Žolė buvo sukarpyta
- 5 žirklėmis į 1 cm gabaliukus ir sudėta į plastmasinius maišelius po 80 g šviežios žolės į kiekvieną. Vienodi bandiniai buvo apdoroti kai kuriomis citolazės-123 frakcijų A, B, C ir D kombinacijomis. Po apdorojimo
- 10 fermentais žolė po 5 g buvo sudėta į 20 ml anaerobinių kultūrų mėgintuvėlius, į kuriuos 5 minutes leistos anaerobinės dujos. Po to mėgintuvėliai buvo užkimšti butilo guminiais kamščiais. Kiekvienam tyrimui paruošta po devynis vienodus bandinius. Mėgintuvėliai buvo
- 15 laikomi 30°C temperatūroje ir po vieną iš kiekvienų devynių bandinių atidaroma praėjus 1, 2 ir 4 savaitėms. Visas mėgintuvėlio turinys (5 g) buvo sunaudotas kaip bandinys tyrimui.
- 20 Medžiagų ištekejimo nustatymas. Vieno mėgintuvėlio turinys (5 g) buvo patalpintas į išbalansuotą perforuotą plastmasinį mėgintuvėlį, kuris įdėtas į 50 ml centrifuginį vamzdelį su 2 cm tarpine dugne. Mėgintuvėliai 20 minučių buvo centrifuguojami Sorvall
- 25 centrifūgoje SS- 34, esant 1000 apsisukimų per minutę. Perforuotas vidinis mėgintuvėlis buvo vėl subalansuotas ir apskaičiuotas ištekęsios medžiagos kiekis (medžiagos ištekejimas = 5 - nuosėdų svoris).
- 30 Rūgščių gamyba buvo ištirta keliais skirtingais būdais. Ištekęsųjų medžiagų silose pH išmatuotas, praėjus 1, 2 ir 4 savaičių inkubaciniam laikotarpiui. Tuo pačiu metu nustatytos titruojamos rūgštys. Šiame tyrime nebuvo
- 35 ištrauktos rūgštys druskų pavidalu, kai ištekęsųjų medžiagų pH vertė 4. Pieno rūgštis yra viena iš rūgščių, kurių pH vertė mažesnė negu pradinis titravimo pH. Pieno rūgštis ir acto rūgštis buvo atskirai

tiriamos, naudojant HPLC su H⁺ pavidalo kolonėle ir UV detektavimą ties 210 nm.

5 Rūgšties titravimas. Į mėgintuvėlį, kuriame yra 5 g siloso, įpilama 15 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlis purtomas kambario temperatūroje vieną valandą; jo turinys nufiltruojamas per 0,2 µm filtrą ir padalijamas į tris lygias dalis. Du bandiniai naudojami organinių rūgščių analizei, o trečiasis - rūgšties titravimui.

10 Bandinys atskiestas distiliuotu vandeniu ir titruotas, naudojant 0,05 M NaOH, iki neutralumo. Indikatoriumi naudotas fenolftaleinas.

Rezultatai apibendrinti 4 lentelėje.

15

4 lentelė.

Citolazės ir fermentų frakcijų įtaka medžiagų ište-
kėjimui ir siloso cheminei sudėčiai

20

Fermen- tas	Medžiagų išteke- jimas 28 diena	pH 7 diena	pH 28 diena	Pieno rūgštis 7 diena	Pieno rūgštis 28 diena	Titras 7 diena	Titras 28 diena
-	0.45	4.04	4.02	145	171	107	135
ABCD	0.65	3.96	3.95	164	196	138	173
ABC	0.53	4.15	4.06	148	175	117	147
ABD	0.63	3.99	3.91	184	223	138	173
ACD	0.61	4.05	3.96	171	206	123	154
BCD	0.56	4.12	4.04	155	184	116	146
AB	0.52	4.11	4.03	156	186	117	147
AC	0.49	4.17	4.08	154	183	104	131
AD	0.59	4.08	4	176	206	123	154
BC	0.46	4.11	4.03	155	184	113	141
BD	0.55	4.09	4	159	190	116	146
CD	0.56	4.09	4	139	193	111	139
A	0.48	4.2	4.12	150	177	104	131

B	0.45	4.08	3.99	151	179	113	141
C	0.46	4.07	3.99	161	193	107	135
D	0.54	4.12	4.04	153	181	111	139

Vertės yra pateiktos šviežio svorio pagrindu.

5 Iš aukščiau pateiktų rezultatų matyti, kad silosas buvo gerai išsaugotas, turi pH apie 4 ar net mažiau ir didelę pieno rūgšties koncentraciją.

10 Medžiagų ištekejimas iš drėgno derliaus priklauso nuo fermentų frakcijų A ir D, o pastaroji frakcija ypatingai aktyvi. Fermentų frakcija D lemia žalingų medžiagų ištekejimą. Naudojant frakciją A, medžiagų ištekejimas sustoja po 14-tos dienos, o naudojant frakciją D, ištekejimas nesustoja per visą silosavimo periodą.

15

4 pavyzdys

20 Manoma, kad dariniai, tokie kaip kombinacijos ABC, ACD, AC ir ABD, o taip pat ir kitos kombinacijos, gali būti pagaminti genetiniu būdu iš celiulazės šaltinio. Pavyzdžiui, celobiohidrolazės I, celobiohidrolazės II, endogliukanazės I ir jų kombinacijų fermentų genų kodavimas gali būti ištrintas iš *Trichoderma* rūšies. Laukiama, kad celiulazė, išskirta iš rūšių su trūkstamais genais, turėtų panašią įtaką derliui, kaip atitinkamų celiuliozės frakcijų, gautų iš anijonitinės kolonėlės, kombinacijos.

30 Taip pat manoma, kad išvalyta ar praturtinta fermentais celiulazė turės panašią įtaką derliui, kaip ir celiulazės atitinkamos kombinacijos, frakcionuotos jonitinėje kolonėlėje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fermentų kompozicija, apimanti daugiafermentinę celiuliazinę medžiagą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent apie 99% minėtos celiulazinės medžiagos susijungia su Q-sefarozės anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui, maždaug ekvivalentiškam 20mM tris-buferio laidumui.
2. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent apie 99% šios celiulazinės medžiagos susijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui, maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,08 M NaCl, laidumui.
3. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent apie 99% šios celiuliazinės medžiagos susijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui, maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,15 M NaCl, laidumui.
4. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a t i tuo, kad bent apie 99% šios celiuliazinės medžiagos (i) susijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,08 M NaCl, laidumui ir (ii) išsiplauna iš minėto anijonito, esant laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,15 M NaCl, laidumui.
5. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent apie 99% šios celiuliazinės medžiagos (i) susijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui maždaug apie 20 mM tris-buferio laidumui ir (ii) išsiplauna iš šio anijonito, esant laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,15 M NaCl, laidumui.

6. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad bent apie 99% šios celiuliazinės
medžiagos (i) susijungia su anijonitu, esant pH apie 8
ir laidumui maždaug apie 20 mM tris-buferio laidumui ir
(ii) išsiplauna iš šio anijonito, esant laidumui
maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra
0,08 M NaCl, laidumui.
7. Fermentų kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad bent apie 99% šios celiuliazinės
medžiagos (i) susijungia su anijonitu, esant pH apie 8
ir laidumui maždaug 20 mM tris-buferio laidumui ir (ii)
išsiplauna iš minėto anijonito, esant laidumui maždaug
ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra maždaug
0,01-0,08 M NaCl, laidumui ir laidumui maždaug
ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra daugiau
kaip maždaug 0,15 M NaCl, laidumui.
8. Fermentų kompozicija, apimanti daugiafermentinę
celiuliazinę medžiagą, b e s i s k i r i a n t i tuo,
kad bent apie 95% šios celiulazinės medžiagos yra
celiuliazinė medžiaga, kuri (i) nesusijungia su Q-
sefarožės anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui
maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio laidumui,
(ii) susijungia su minėtu anijonitu, esant pH apie 8 ir
laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio,
kuriame yra 0,08 M NaCl, laidumui, arba (iii) yra (i)
ir (ii) punktų kombinacija.
9. Fermentų kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad bent apie 95% šios celiuliazinės
medžiagos yra celiuliazinė medžiaga, kuri (i) nesusi-
jungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui
maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio laidumui,
(ii) susijungia su minėtu anijonitu, esant pH apie 8 ir
laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio,

kuriame yra 0,15 M NaCl, laidumui arba (iii) yra (i) ir (ii) punktų kombinacija.

5 10. Fermentų kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i tuo, kad bent apie 95% minėtos
celiuliazinės medžiagos nesusijungia su anijonitu,
esant pH apie 8 ir laidumui maždaug ekvivalentiškam 20
mM tris-buferio laidumui.

10 11. Fermentų kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i tuo, kad bent apie 95% minėtos
celiulazinės medžiagos yra celiuliazinė medžiaga kuri
(i) nesusijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir
laidumui maždaug ekvivalentiškam laidumui 20 mM tris-
15 buferio, (ii) susijungia su minėtu anijonitu, esant pH
apie 8 ir laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-
buferio, kuriame yra tarp maždaug 0,08 ir 0,15 M NaCl,
laidumui arba (iii) yra (i) ir (ii) punktų kombinacija.

20 12. Fermentų kompozicija, apimanti daugiafermentinę
celiulazinę medžiagą, b e s i s k i r i a n t i tuo,
kad bent apie 95% minėtos celiulazinės medžiagos yra
celiuliazinė medžiaga, kuri (i) nesusijungia su
anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui maždaug
25 ekvivalentiškam laidumui 20 mM tris-buferio, kuriame
yra maždaug 0,08 M NaCl, (ii) susijungia su minėtu
anijonitu, esant pH maždaug 8 ir laidumui maždaug
ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra 0,15 M
NaCl, laidumui, arba (iii) yra (i) ir (ii) punktų
30 kombinacija.

13. Fermentų kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i tuo, kad joje bent apie 95% minėtos
celiuliazinės medžiagos nesusijungia su anijonitu,
35 esant pH apie 8 ir laidumui maždaug ekvivalentiškam 20
mM tris-buferio, kuriame yra maždaug 0,08 M NaCl,
laidumui.

14. Fermentų kompozicija, apimanti daugiafermentinę celiulazinę medžiagą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje bent apie 95% minėtos celiuliazinės medžiagos nesusijungia su anijonitu, esant pH apie 8 ir laidumui maždaug ekvivalentiškam 20 mM tris-buferio, kuriame yra maždaug 0,15 M NaCl, laidumui.
5
15. Pašarinių kultūrų apdorojimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į šias kultūras prideda celiuliazinės medžiagos tirpalą apibūdintos pagal bet kurią iš 1-14 punktų.
10
16. Pašarinių kultūrų apdorojimo būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta celiuliazės tirpalą prideda į augančias kultūras, nuimtas kultūras arba nuimtas kultūras 48-ių valandų laikotarpyje prieš šeriant gyvulius šiomis kultūromis.
15

FIG. 1

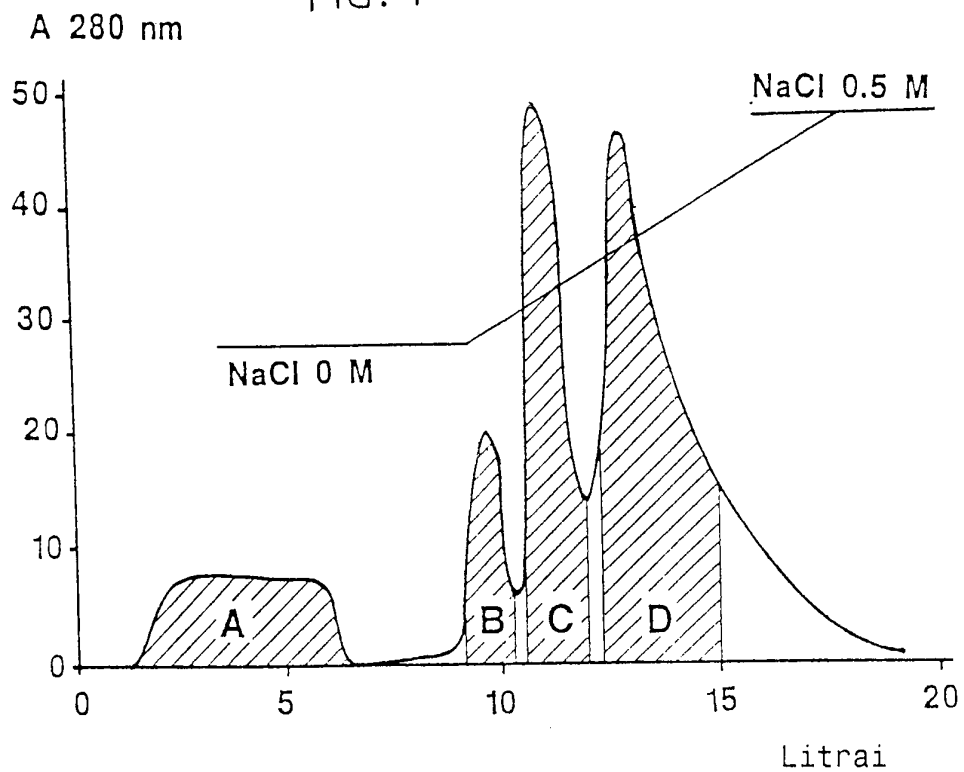
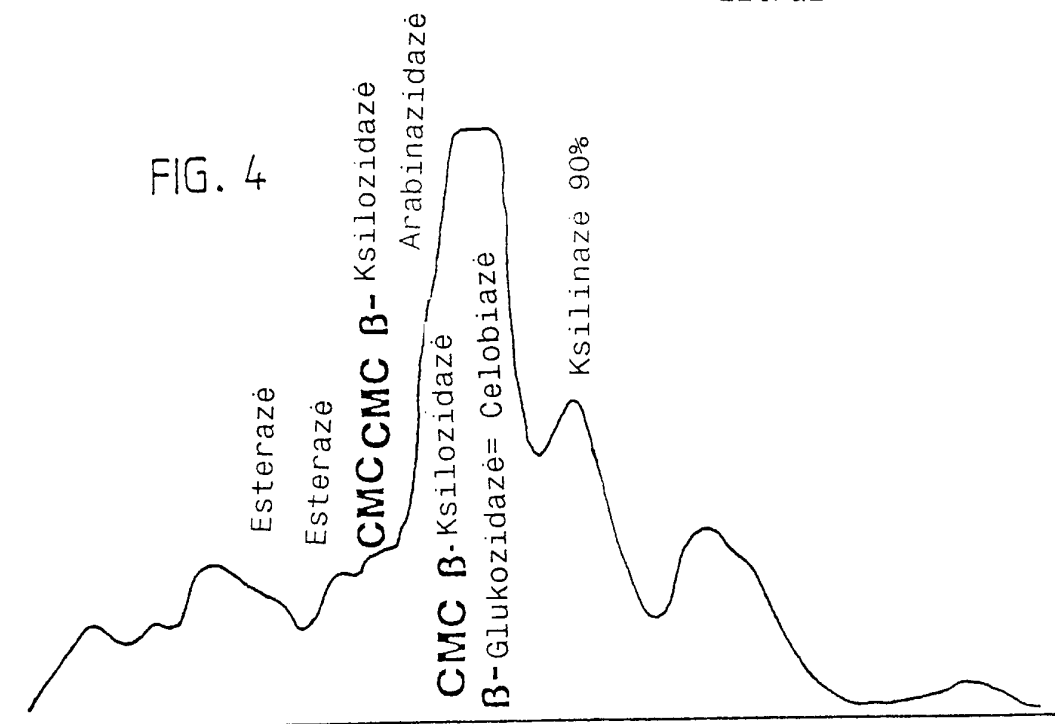


FIG. 4



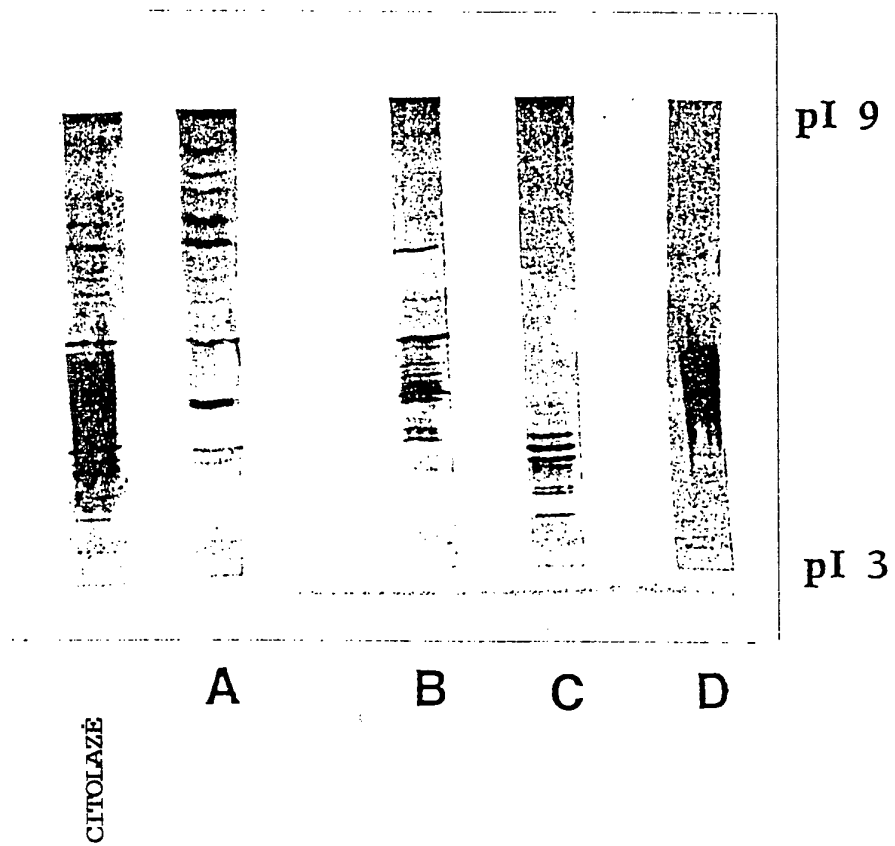


FIG.2

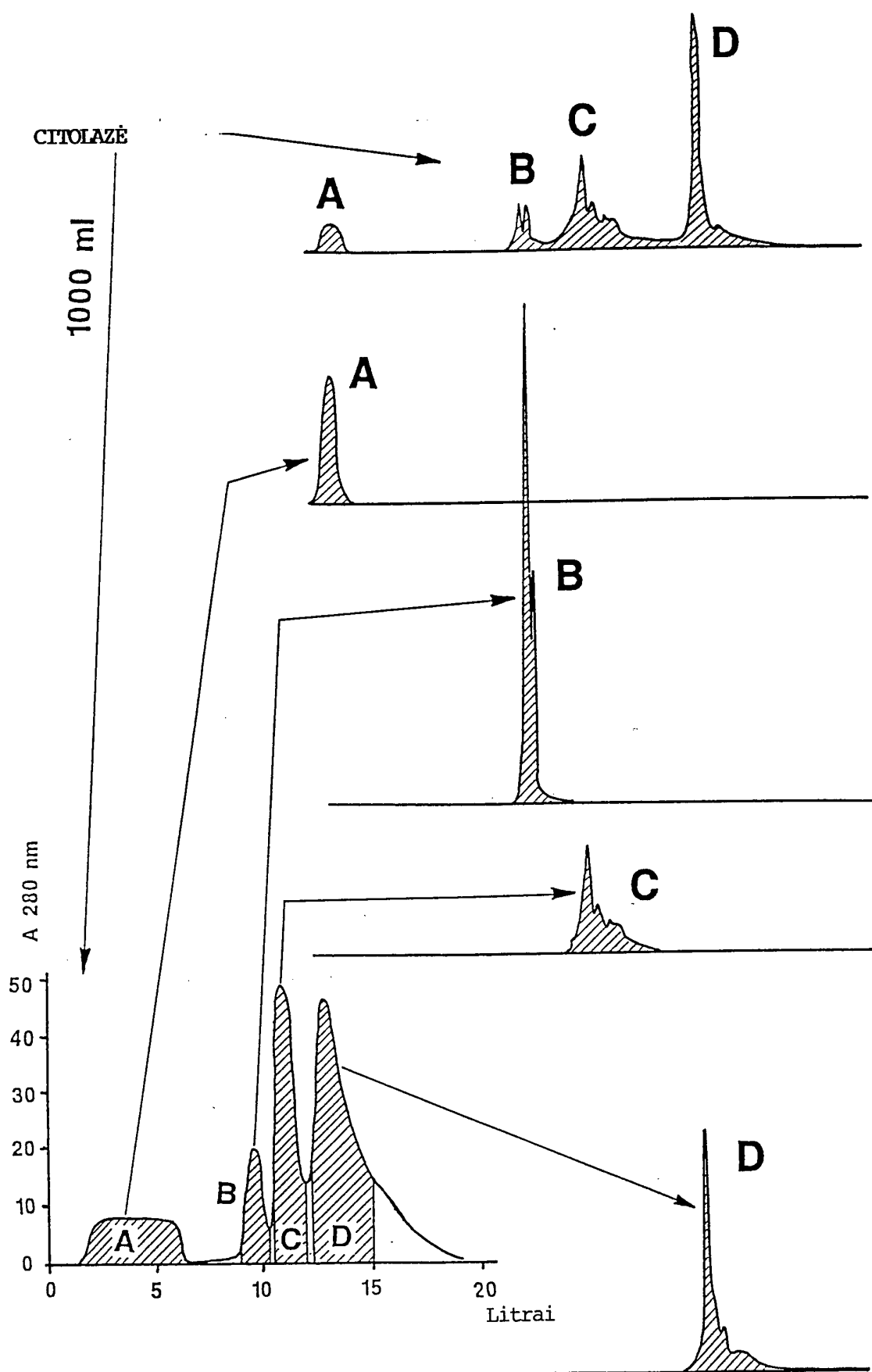


FIG. 3