



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 67069

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 11/00

A23K 1/165

C12N 1/20

C12R 1/07 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНОГО ПРЕПАРАТУ З КОМПЛЕКСОМ ПЕКТОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ ДОБАВЛЕННЯ В КОРМ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИМ ТВАРИНАМ І ПТИЦІ

1

2

(21) 2003065931

(22) 26.06.2003

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Болоховська Валентина Антонівна, Бобкова Людмила Романівна, Болоховський Владислав Вікторович, Благодір Алевтина Михайлівна, Гуцол Анатолій Васильович, Мазуренко Микола Олександрович, Нагорна Ольга Володимирівна

(73) Приватне підприємство "БТУ-ЦЕНТР"

(56) UA A 10063, 30.09.96.

SU A3 1679962, 23.09.91.

SU A3 1544171, 15.02.90.

SU A1 1521432, 15.11.89.

SU 933063, 07.06.82.

SU 888911, 15.12.81.

RU C1 2007456, 15.02.94.

RU C1 2097979, 10.12.97.

RU C2 2173159, 10.09.01.

RU A 2000128039, 20.02.03.

RU A 2000100315, 20.12.01.

US 2494514, 10.01.50.

UA A 10676, 25.12.96.

(57) Спосіб одержання іммобілізованого препарату з комплексом пектолітичних ферментів для добавлення в корм сільськогосподарським тваринам та птиці (основний фермент - пектат-транселіміназа), що включає культивування мікроорганізма-продуцента та іммобілізацію фермента на природному носії, який **відрізняється** тим, що як мікроорганізм-продуцент використовують штам *Bacillus pascuans* IMB B-7086, як природний носій - пшеничні висівки або аналогічний природний носій, а іммобілізацію фермента здійснюють шляхом наплення культуральної рідини на природний носій при кімнатній температурі в співвідношенні 1:(2-4) з подальшим висушуванням при температурі 30-35°C протягом 24 годин.

Винахід належить до мікробіологічної промисловості, до галузі виробництва ферментних препаратів і може бути використаний у сільському господарстві для підвищення засвоюваності кормів у сільськогосподарських тварин і птиці, а також для одержання мультиензимних композицій і преміксів, що застосовуються для вищевказаних цілей.

В теперішній час біохімічну діяльність мікроорганізмів широко використовують при виробництві ферментних препаратів, які застосовують для підвищення ефективності використання сировини при годівлі сільськогосподарських тварин і птиці.

В тваринництві ферментні препарати застосовують в якості добавок в корм сільськогосподарським тваринам, в першу чергу молодняку. Добавка в корм ферментних препаратів покращує травлення поживних речовин раціону поросят на 4-7%, тим самим збільшує приріст свиней на 4-15%,

знижуються витрати кормів на 1кг приросту на 4-10%.

У молодняка жуйних тварин ферментна система шлунково-кишкового тракту пристосована для використання материнського молока, спочатку виділяє недостатню кількість травних ферментів, необхідних для травлення поживних речовин рослинних кормів. Тому для заміни молока кормами рослинного походження і кращого їх використання в раціоні телят доцільно вводити пектолітичні ферменти, які сприяють розщепленню і засвоєнню грубих кормів (гідроліз клітковини пектинових субстратів). Добавка в корм пектолітичних ферментів сприяє збільшенню приросту худоби на 5-23%, зниженню витрат кормів на 5-17% і підвищенню ефективності використання поживних речовин кормів на 3-8%.

В птахівництві ферментні препарати використовують для покращення засвоєння кормів. Травні

(13) C2

(11) 67069

(19) UA

залози птиці не виділяють ферментів, що гідролізують целюлазу, пектини і інші полісахариди. Додатки в комбікорма ферментних препаратів, які містять целюлази, геміцелюлази, пектинази і т.п., сприяють руйнуванню оболонок рослинних клітин і підвищують травлення і засвоєння поживних речовин раціону - середньодобові прирости збільшуються на 7-15%, вихід тушок - на 9-12%, витрата корму на одиницю приросту знижується на 4-10%, яйценосність збільшується на 5% [А.А.Глемжа, Л.Л.Люджос, Л.И.Петрова „Микробные ферменты в народном хозяйстве“, Вильнюс, „Мокслас“, 1985г.].

Висока ефективність застосування ферментів відкриває широкі перспективи для подальшого їх виробництва. Тому необхідні ретельне і глибоке дослідження і співставлення різних шляхів інтенсифікації технологічних процесів, збільшення виходу і підвищення якості готової продукції мікробіологічного синтезу.

Відомі різноманітні продуценти синтезу комплексу пектолітичних ферментів видів *Bacillus macerans* і *Bacillus circulans*, які мають ряд недоліків і переваг.

Основним критерієм відбору продуценту по ферментативній активності є синтез пектат-трансєлімінази (ПТЕ), як одного із провідних ферментів, що відповідає за мацерацію (руйнування) структури клітинних стінок рослин і підвищенню засвоюваності кормів з високим вмістом протопектину і лігніну, які є цементуючим матеріалом між окремими клітинами рослин.

Відомий штам бактерій *Bacillus circulans* - БТ ВКПМ-5622 - продуцент комплексу пектолітичних ферментів і ксиланази [патент України №10676А, оп.25.12.96]. Вищезгаданий штам продукує пектолітичні ферменти, у тому числі і ксиланазу. Активність пектат-трансєлімінази (ПТЕ) на середовищі, що містить в якості джерела вуглецю буряковий жом, складає 2300-4800од/см<sup>3</sup> ендopolігалактуро-нази (ендо-ПГ) - 12-35од/см<sup>3</sup>, екzopolігалактуро-нази (екзо-ПГ) - 12-30од/см<sup>3</sup>, ксиланази - 20-30од/см<sup>3</sup>. Штам має відносно високі усереднені характеристики по накопиченню пектолітичних ферментів, проте ці показники нестабільні, спостерігаються різкі коливання по значенням активностей в різних операціях культивування.

Найбільш близьким штамом-прототипом до заявленого є штам *Bacillus macerans* ЦМГМ В-2692 - продуцент пектолітичних ферментів, який в умовах глибинного культивування утворює комплекс мацеруючих ферментів, в тому числі ПТЕ з активністю 900од/см<sup>3</sup>, ендо-ПГ з активністю 6,5од/см<sup>3</sup>, екзо-ПГ з активністю 5,0од/см<sup>3</sup>. Максимальний вміст ферментів в культуральній рідині досягається на 18-20 годину культивування.

Суттєвим недоліком вказаного штаму є низька активність ендо- і екзо-ПГГ, а також відсутність синтезу ксиланази.

Традиційний спосіб одержання сухих (товарних) форм кормових ферментних препаратів невисокого ступеня очистки включає в себе стадію культивування, рідинної стандартизації і сушки. Загальні втрати активності в процесі її напрацювання складають 50-90%.

У найбільш поширених випадках одержання пектолітичних ферментів з культуральної рідини *Bacillus macerans* і *Bacillus circulans* препарат одержують висушуванням культуральної рідини на розпилюючій сушарці в потоці гарячого повітря при температурі 130-140°C на вході в сушарку і 60-70°C на виході з сушарки. При цьому одержують концентрат ферменту у вигляді сухого порошку, який зручний при зберіганні і транспортуванні.

Проте вище названий спосіб має ряд недоліків, а саме:

- забруднення навколишнього середовища викидами відпрацьованого повітря з пилом препарату або дороговартісна очистка викидів;

- високі (до 80%) втрати продукту із-за інактивації ферменту при високій температурі і виносом продукту з відпрацьованим повітрям.

В останній час в практику впроваджують використання іммобілізованих ферментів. Іммобілізовані ферменти тривалий час зберігають активність при зберіганні і практично повністю засвоюються при застосуванні, так як знижується інактивація в шлунково-кишковому тракті під дією надто кислого середовища. Також при одержанні таких препаратів виключається стадія сушки при високій температурі, що значно знижує втрати ферментів.

Найбільш близьким за технічною сутністю є спосіб одержання препарату з протеолітичною активністю для годівлі сільськогосподарських тварин і птиці [патент України №10063А, оп.30.09.96], що включає іммобілізацію ферменту на мінеральному носії, в якому іммобілізацію здійснюють шляхом перемішування носія і ферменту в фосфатному буферному розчині з рН 6,8-7,2 протягом 1,5-2,5 години при кімнатній температурі.

В даному винаході в якості ферменту іммобілізують вже готовий сухий ферментний препарат - очищений і висушений на розпилюючій сушарці, що викликає за собою великі витрати і втрати активності ферменту. Сухий препарат перед іммобілізацією розчиняють, що також збільшує втрати і трудоемкість.

Метою даного винаходу є розробка способу одержання препарату з пектолітичною активністю для годівлі сільськогосподарських тварин і птиці, в якому виключаються великі втрати при переробці культуральної рідини, збільшується стабільність препарату при тривалому зберіганні і збільшення коефіцієнту дії препарату в шлунково-кишковому тракті тварин і птиці.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання іммобілізованого препарату Мацераза з комплексом пектолітичних ферментів для добавки в корм сільськогосподарським тваринам і птиці передбачає культивування мікроорганізму - продуценту штаму *Bacillus macerans* 2702 Л, а іммобілізацію здійснюють змішуванням культуральної рідини з природним носієм (пшеничні висівки або аналогічний природний продукт) при кімнатній температурі в співвідношенні 1:(2-4) з послідувочою сушкою при температурі (30-35)°C протягом 24 годин.

При цьому 1г одержаного препарату містить  $\geq 500$ од. пектат-трансєліміназної активності, вихід ферменту від культуральної рідини складає 60-80%, масова доля води - не більше 10%, зовні-

шній вигляд - сухий сипкий продукт без твердих грудочок. Спільними з прототипами ознаками є:

- використання в якості мікроорганізму - продуценту штаму *Bacillus macerans* ;
- використання природного носія для іммобілізації ферменту.

Відмінними ознаками є:

- використання нового удосконаленого штаму *Bacillus macerans* 2702Л, що характеризується з підвищеною здатністю синтезувати комплекс пектолitiчних ферментів, володіючого більш широким спектром синтезуючих ферментів, включаючи ксиланазу, а також швидким циклом росту;
- значним зниженням трудових і матеріальних витрат на виробництво препарату в зв'язку з використанням в якості напівпродукту стабілізованої культуральної рідини без сушки на розпилюючій сушарці;
- одержання більш стабільного при зберіганні препарату, в зв'язку з висушуванням при достатньо низьких температурах.

Одержаний штам *Bacillus macerans* 2702Л депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України в грудні 2002 року з реєстраційним номером *Bacillus macerans* 1MB B-7086. Штам виділений направленою селекцією в результаті багаторазового розсіву вихідного штаму *Bacillus macerans* ЦМПМ B-2692, непатогенний і має наступні характеристики:

1. Культурально-морфологічні і фізіологічні особливості штаму:

На картопляному агарі колонії плоскі, матові, діаметр 5-8мм, край нерівний, непрозорий, колір колоній бежевий. Структура зерниста. На МПА колонії діаметром 2мм від світло-бежевого до бежевого кольору, плоскі. Центр куполоподібний, край нерівний, непрозорий. Структура зерниста. На СА колонії плоскі, шершаві, центр блискучий, край нерівний.

Грампозитивні, прямі палички 3-4×0,8-1мкм, рухомі. Утворюють спори, еліптичні, без експоріума розміром 1,1×1,8; розташовуються центрально і субтермінально.

Факультативний анаероб. Оптимальна температура росту (35-40)°С. Оптимум рН 7,9-8,3. Каталазопозитивний. Засвоює глюкозу, сахарозу, галактозу, фруктозу. Розкладає казеїн, гідролізує крохмаль. Відновлює нітрати. Не утворює індол.

Галузь застосування штаму: біотехнологія.

Продукт, який синтезується штамом: комплекс пектолitiчних ферментів (пектат-трансєліміназа, ендо- і екзо-полігалактуроназа, ксиланаза).

Активність штаму: на середовищі складу, %: екстракт кукурудзяний - 0,75, буряковий жом - 2,75, сечовина - 0,75, калій сірчаноокислий - 0,2. кальцій хлористий - 0,25, калію гідроксид - 0,2 після культивування на качалці при 180об/хв., температурі 40°С протягом 20-24годин ПТЕ активність - 4500-6900од/см<sup>3</sup>, екзо-ПГ - до 250од/см<sup>3</sup>, ендо-ПГ - 35-87од/см<sup>3</sup>, ксиланазна 15-50од/см<sup>3</sup>. Активність визначають прямим спектрофотометруванням продуктів реакції пектолiзу при довжині хвилі 230-235нм в ультрафіолетовій області.

Генетичні особливості: прототроф, фатостійкий, непатогенний.

Культивування в виробництві здійснюють як в анаеробних, так і в аеробних умовах, при перемішуванні, температурі (35-40)°С, рН 7,8-8,2 протягом 18-24 годин на стерильному поживному середовищі, що містить жом буряковий мелений, сечовину, калій сірчаноокислий, кальцій вуглекислий, екстракт кукурудзяний, калію гідроксид, воду питну.

В одержаній культуральній рідині ПТЕ активність складає не менше 3000од/см<sup>3</sup> (до 4500-6000од/см<sup>3</sup>), екзо-ПГ - 200-250од/см<sup>3</sup>, ендо-ПГ - 40-80од/см<sup>3</sup>.

Для стабілізації в культуральну рідину вносять хлористий кальцій в кількості 0,02-0,04% і встановлюють рН 7,5-8,5 додаванням розчину натрію гідроксиду або калію гідроксиду.

Напилення здійснюють на підсушений носій різними способами: через розпилюючий пристрій в стаціонарних умовах або на носій, котрий рухається по транспортеру, або методом киплячого шару в перемішуючому пристрої типу турбозмішувача.

Способи сушки також можуть бути різні: сушка на полках в натуральних умовах, в сушильних або вакуум-сушильних шафах при оптимальній температурі (30-35)°С.

Вихід готового продукту по активності складає 60-80%.

Ефективність дії іммобілізованого препарату Мацераза перевіряли в пробіркових дослідах і в дослідах на молодняку свиней на дорощуванні та відгодівлі. Встановлено, що згодовування одержаного таким чином препарату стимулювало приріст живої маси, сприяло зниженню витрат корму на одиницю приросту маси.

Технічне розв'язання поставлених завдань пояснюється наступними прикладами.

#### Приклад 1

З метою одержання препарату приготували рідке поживне середовище, що містить в якості джерела вуглецю жом буряковий, а також мінеральні солі, в якості джерела азоту - кукурудзяний екстракт, сечовину. Культуральну рідину вирощували на качалці з числом обертів 180хв<sup>-1</sup> при температурі 40°С і рН 8,0 протягом 18 годин. В одержану культуральну рідину (об'єм 10л) з ПТЕ активністю, рівною 4000од/см<sup>3</sup>, добавили хлористий кальцій в кількості 0,025% до об'єму, довели рН до 8,0 10% розчином натрію гідроксиду. Стабілізовану культуральну рідину нанесли на підсушені в сушильній шафі пшеничні висівки. Суміш висушили в сушильній шафі при температурі 32°С протягом 24 годин. З операції одержано 40кг готового продукту з ПТЕ 750од/г і вологістю 9%. Вихід препарату по відношенню до культуральної рідини склав 75%.

#### Приклад 2

Препарат одержували, як описано вище, але в виробничих умовах - в ферментаторі ємністю 1,0м. Процес культивування здійснювали при перемішуванні мішалкою в аеробних умовах з витратою повітря 0,4-1,0м<sup>3</sup> повітря на 1м поживного середовища за 1хв., при температурі (38-40)°С і рН 7,8-8,2 протягом 20 годин. Одержано 300л культуральної рідини з ПТЕ активністю 3600од/см<sup>3</sup>. Із стабілізованої культуральної рідини одержали 1200кг готового продукту з ПТЕ 700од/г і вологістю 10%.

Вихід препарату по відношенню до культуральної рідини склав 77,8%.

Одержані в прикладі 1 і в прикладі 2 препарати поставили на зберігання при кімнатній температурі. Контроль через 3, 6, 9, 12, 18, 24 місяці показав 100% зберігання пектат-трансєлімінасної активності препарату.

#### Приклад 3

Вивчення впливу імібілізованого препарату Мацераза на продуктивність молодняка свиней і порівняння його дії з препаратом аналогічної властивості, але одержаного методом розпилюючої сушки із культуральної рідини без імібілізації.

Досліди з молодняком свиней білої великої породи проводились на базі сільгоспдприємства СТОВ „Мрія” Шаргородського району Вінницької області під керівництвом спеціалістів Вінницького Державного Аграрного Університету. Умови утримання і режим згодовування контрольних і дослідних груп протягом експерименту були ідентичні. В якості корму використовувались кормосуміші із дерті ячмінної, пшеничної, кукурудзяної і трави люцерни у відповідності із зоотехнічними нормами.

В дослідних групах в додаток до основного раціону добавляли препарат із культуральної рідини *Bacillus macerans* 2702Л, одержаний висушуванням на розпилюючій сушарці (Мацерабацілін, умовно названий Препарат Р) і Мацеразу, одержану шляхом напilenня культуральної рідини на висівки, в кількості від 0,2г до 0,6г на 100кг живої ваги за добу.

По закінченні першого етапу експерименту встановлено, що у свиней, в раціон яким включали Препарат Р і Мацеразу, покращилась засвоюваність корму. При цьому продуктивність дії вище у Мацерази, одержаної напilenням на субстрат. Середньодобові прирости свиней на дорощуванні збільшились на 19-21%, витрати кормів на 1кг приросту зменшились на 16,1-17,1%. Оптимальна доза препарату Мацерази в даному випадку складала 0,2г на 100кг живої ваги.

Використання Препарату Р і Мацерази в дозах 0,4г на 100кг живої ваги за добу при заключній відгодівлі свиней сприяло збільшенню середньодобових приростів тварин на 22,6% і 26,0%, зменшенню витрат кормів на 1 кг приросту на 18,5% і 20,7% відповідно.

Результати, одержані при проведенні експерименту, дозволяють зробити заключения, що використання Препарату Р і Мацерази сприяють підвищенню продуктивності відгодованих свиней. Кращі показники, як на відгодівлі і особливо на дорощуванні свиней, одержані при використанні Мацерази, напленої на субстрат, що дозволяє зробити попередній висновок про економічну доцільність використання препарату Мацерази при вирощуванні свиней.

Результати експерименту наведені в таблицях 1, 2.

Таблиця 1

Показники продуктивності молодняка свиней на дорощуванні препаратом Р і Мацеразою (n=15 голів)

Показник	Препарат Р (Мацерабацілін)						
	Контроль	1 група	2 група	3 група	4 група	5 група	6 група
Доза препарату, г/на 100кг живої ваги на добу		0,2	0,4	0,6	0,2	0,4	0,6
Жива вага однієї голови:							
на початок періоду, кг	24,2	24,0	23,4	23,8	24,9	23,5	24,5
на кінець періоду, кг	53,27	55,5	53,4	54,7	59,6	58,8	59,6
Приріст живої ваги, кг	29,1	31,5	30,0	30,9	34,7	35,3	35,1
Тривалість періоду, дні	90	90	90	90	90	90	90
Середньодобовий приріст, г	323	350	333	343	385	392	390
+ до контролю: г %	-	+27	+10	+20	+62	+69	+67
	100	+8,3	+3,1	+6,2	+19,1	+21,4	+20,7
Витрачено корму на 1 кг приросту, корм. од.	5,66	5,22	5,49	5,33	4,75	4,66	4,69
+ до контролю: корм. од. %	-	-0,44	-0,17	-0,33	-0,91	-1,0	-0,97
	-	-7,8	-3,0	-5,8	-16,1	17,6	-17,1

Таблиця 2

Показники продуктивності молодняка свиней при відгодівлі, (n=10 голів)

Показник	Контроль	Препарат Р (Мацерабацілін)	Мацераза
Доза препарату, г/на 100 кг живої ваги			
Жива вага 1 голови:			
на початок періоду, кг	54,9	55,0	54,8
на кінець періоду, кг	98,75	108,45	110,0
Приріст живої ваги, кг	43,85	53,75	55,2
Тривалість періоду, дні	100	100	100
Середньодобовий приріст, г	438	537	552
+ до контролю: г	-	+99	+114
%	100	+22,6	+26
Витрачено корму на 1 кг приросту, корм. од.	6,34	5,17	5,03
+ до контролю: корм. од. %	-	-1,17	-1,31
	-	-18,5	-20,7

Таким чином, препарат, одержаний обома способами, дає позитивний ефект при використанні в годівлі молодняка свиней, але вищою є продуктивна дія Мацерази, одержаної напilenням на субстрат -наповнювач, так як при їх застосуванні одержані майже втричі вищі середньодобові прирости молодняка свиней, а також кращі показники на відгодівлі свиней.