



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 254 594 A1

4(51) C 12 Q 1/34
C 12 Q 1/58

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 297 432 4	(22)	11.12.86	(44)	02.03.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock, Schwarzer Weg, Dummerstorf, 2551, DD
(72)	Block, Hans-Joachim, Dr. rer. nat.; Weißbach, Friedrich, Prof. Dr. sc., DD

(54)	Verfahren zur Bestimmung der In-vitro-Verdaulichkeit von Futtermitteln, insbesondere von Aufschlußstroh
------	---

(55) Verfahren, Futtermittel, Aufschlußstroh, Verdaulichkeit, in vitro, Cellulasebehandlung, alkalisch, Vorbehandlung, Substanz, organisch

(57) Die Erfindung betrifft ein chemisch-enzymatisches Prüfverfahren zur Ermittlung von Futterwertkennndaten für Futtermittel, insbesondere für chemisch aufgeschlossenes Stroh. Es kann in vitro sowohl die Verdaulichkeit der organischen Substanz als auch der Gehalt an unverdaulicher organischer Substanz bestimmt werden. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß vor der Cellulasebehandlung eine alkalische Vorbehandlung der Futtermittel bei erhöhter Temperatur erfolgt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung der In-vitro-Verdaulichkeit von Futtermitteln, insbesondere von Aufschlußstroh, wobei die Behandlung der Futtermittel mit einem Cellulasekomplex erfolgt, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor der enzymatischen Behandlung eine alkalische Vorbehandlung der Futtermittel bei erhöhter Temperatur durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur alkalischen Vorbehandlung Lösungen aus Alkali- oder Erdalkalicarbonaten, Ammoniumcarbonaten oder Mischungen aus solchen verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der alkalischen Lösungen zwischen 0,1 % und 1,5 % (g/v) beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die alkalische Vorbehandlung bei Erhitzung auf 60–120°C vorgenommen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die alkalische Vorbehandlung 5 min bis drei Stunden lang vorgenommen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein chemisch-enzymatisches Prüfverfahren zur Ermittlung von Futterwertkennwerten für Futtermittel, insbesondere für chemisch aufgeschlossenes Stroh. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann in vitro sowohl die Verdaulichkeit der organischen Substanz als auch der Gehalt an unverdaulicher organischer Substanz von Aufschlußstroh bestimmt werden. Das Verfahren ist insbesondere für die staatliche Futtermittelprüfung geeignet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Ermittlung der Verdaulichkeit von Futtermitteln sind Verfahren bekannt, bei denen Cellulasen pilzähnlicher Herkunft benutzt werden. Meist werden hierbei Kombinationen mit säurehydrolytischen bzw. extrahierenden Vorbehandlungsschritten verwendet. Im Falle der Untersuchung von Stroh ist auch die alleinige Cellulasebehandlung bekannt. Unabhängig vom angewendeten Verfahren wird bei der Untersuchung von unbehandeltem bzw. chemisch aufgeschlossenem Stroh hierbei eine schlechte Übereinstimmung zwischen den in vitro und in vivo gemessenen Verdaulichkeiten erzielt. Offensichtlich reichen die Lösungseigenschaften cellulolytischer Enzymkomplexe bei stärker lignifizierten Futterstoffen bei den bisher bekannten Vorbehandlungsmethoden im sauren bzw. neutralen Milieu bei weitem nicht an die Verdauungspotenzen des Wiederkäuers heran.

Des weiteren sind Verfahren bekannt, die unter Nutzung von Pansensaft von Kühen oder Schafen funktionieren. Bei Kombination mit einer Pepsin-Salzsäure-Vorhydrolyse werden bei Untersuchung von Aufschlußstroh die in vivo am Schaf gemessenen Futterwertkennwerte zwar in etwa erreicht. Aufgrund schlechter Bedingungen bei der Standardisierung der Pansensaftqualität zwischen verschiedenen Prüfeinrichtungen hat dieses Verfahren jedoch keine praktische Nutzenanwendung gefunden. Andere In-vitro-Verfahren, wie die Gasbildungsmethode nach dem Hohenheimer Futterwerttest (MIKA, V. u. a.: Ein Vergleich verschiedener Labormethoden zur Schätzung der Verdaulichkeit von Grundfutter; Z. Tierphysiol. Tierernährung und Futtermittelkunde 45 [1981] 132–141), eignen sich aufgrund zu geringer Reproduzierbarkeit ebenfalls nicht zur Bewertung von chemisch behandeltem Stroh.

Ziel der Erfindung

Mit Hilfe der Erfindung soll erstmalig eine Möglichkeit zur objektiven In-vitro-Ermittlung der beim chemischen Strohaufschluß erreichten Futterwertverbesserung als Grundlage für eine ökonomische Bewertung von Aufschlußstroh einschließlich Preisbildung und für den effektivsten Futtereinsatz geschaffen werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, zur Ermittlung der In-vitro-Verdaulichkeit, insbesondere von Aufschlußstroh die unzureichenden Lösungseigenschaften der verwendeten cellulolytischen Enzymkomplexe bei Stroh wesentlich zu verbessern, so daß eine Angleichung der erhaltenen Meßwerte an die im Tierversuch am Schaf meßbaren Verdaulichkeitswerte erreicht

wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß vor der Cellulasebehandlung des Aufschlußstrohs eine gezielte Vorbehandlung mit alkalischen Lösungen unter erhöhter Temperatur erfolgt, wodurch eine gezielte Steigerung der enzymatischen Zugänglichkeit der Strohzellwände für die nachfolgende Behandlung mit Cellulase erreicht wird. Zur Vorbehandlung kommen erfindungsgemäß Lösungen aus Alkali- oder Erdalkalicarbonaten, Ammoniumcarbonaten oder Mischungen aus solchen mit einer Konzentration zwischen 0,1 % bis 1,5 %, vorzugsweise 0,5 % (glv), zur Anwendung. Nach weiteren Merkmalen der Erfindung wird die alkalische Vorbehandlung bei Temperaturen von 60–120°C über einen Zeitraum von 5 bis 180 Minuten durchgeführt. Danach wird die alkalische Extraktionslösung nach ansich bekannten Methoden entfernt. Die sich anschließende enzymatische Behandlung des Futtermittels erfolgt unter Anwendung eines beliebigen cellulolytischen Enzymkomplexes oder von Mischungen des Cellulasekomplexes mit Hemicellulasen, Pektinasen, Amylasen oder Proteasen. Dieser zweite Verfahrensschritt läuft unter erhöhter Temperatur von 30°C bis 60°C über einen Zeitraum von 16 bis 96 Stunden ab. Das Ergebnis des erfindungsgemäß eintretenden Vorbehandlungseffektes ist überraschend, da bisher davon auszugehen war, daß durch ein derartiges Vorgehen der beim eigentlichen alkalischen Strohaufschlußprozeß realisierte Aufschlußeffekt (als Verdaulichkeitszuwachs meßbar) durch nachträgliche Aufschlußwirkungen beim Laborverfahren überdeckt wird und daß bei unterschiedlich stark aufgeschlossenen Strohpartien sämtliche Differenzen nivelliert werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

500 mg Stroh, getrocknet und gemahlen, werden mit 50 ml 0,5%iger Sodalösung versetzt und in einem 95°C heißen Wasserbad nach Wiedererreichen der festgelegten Temperatur eine Stunde vorbehandelt.

Nach Abkühlung wird die alkalische Extraktionslösung auf beliebige Art entfernt. Der ungelöste Rückstand wird mit dest. Wasser nachgewaschen und wieder trockengesaugt. Anschließend wird der Rückstand mit 50 ml Cellulase-Pufferlösung pH 4,6 (5 ml Cellulase HUPc + 45 ml Pufferlösung pH 4,6) versetzt und 48 h bei 40°C im Brutschrank behandelt. Dabei ist träglich einmal umzuschwenken. Abschließend wird der Rückstand auf beliebige Art gravimetrisch erfaßt.

Als Untersuchungsmaterial kam Winterweizenstroh zur Anwendung, das bei einem Wassergehalt von 40 % und Lagerungstemperaturen von 55°C 12 Wochen mit den in Tabelle angegebenen Harnstoffdosen silageähnlich gelagert und dabei durch die Wirkung des durch Ureasewirkung aus dem Harnstoff freigesetzten NH_3 chemisch aufgeschlossen worden ist. Zum Vergleich wurden die am Schaf gemessenen In-vivo-Verdaulichkeiten der organischen Substanz (OM) des Strohes, die nach alleiniger Cellulasebehandlung bzw. nach der Kombination aus Pepsin-Salzsäure-Vorbehandlung mit anschließender Cellulasebehandlung gemessenen In-vitro-Verdaulichkeiten (Stand der Technik) aufgeführt.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die bekannten In-vitro-Verfahren (I + II) unter Einsatz eines Cellulasekomplexes im Vergleich zum Tierversuch (in vivo) bei mit Harnstoff chemisch aufgeschlossenem Stroh viel zu niedrige Verdaulichkeitswerte erbringen. Dieser Nachteil kann erfindungsgemäß durch eine alkalische Vorbehandlung vollständig eliminiert werden (III + IV).

Tabelle 1: Anwendungsbeispiel und Vergleich zum Stand der Technik In-vitro-Verdaulichkeit in % der OM

Material Weizenstroh plus	In-vivo-Verdaulichkeit in % der OM — Schaf —	Vorbehandlung vor der Cellulasebehandlung			
		I ohne	II Pepsin-HCl 24 h 40°C	III 0,5%ige Na_2CO_3	IV 0,5%ige K_2CO_3
0 % Harnstoff	39,9	14,7	14,3	41,8	45,6
2 % Harnstoff	51,8	20,9	21,2	45,3	49,5
4 % Harnstoff	56,8	34,0	30,9	55,5	56,2
6 % Harnstoff	57,2	38,4	32,9	58,5	60,1
8 % Harnstoff	60,7	39,8	32,9	58,6	60,1
10 % Harnstoff	60,2	44,5	39,9	61,3	60,9
	$\bar{d} \pm s_d$ (in vitro minus in vivo)	$-22,4 \pm 5,3$	$-25,8 \pm 3,4$	$-0,9 \pm 3,2$	$1,0 \pm 2,9$

Tabelle 2: OM-Löslichkeit bei den beiden Stufen des neuen In-vitro-Verfahrens — Angaben in % der OM —

Material Weizenstroh plus	Behandlungsschritt			Cellulasebehandlung 48 h		d_2	Summe $d_1 + d_2$
	I	II	d_1	I	II		
	Pufferextraktion pH 7 2 h 95°C	0,5%ige Soda 1 h 95°C		nach Pufferex- traktion	nach Soda- behandlung		
0 % Harnstoff	9,7	18,8	+9,1	7,6	23,0	+15,4	+24,5
2 % Harnstoff	12,5	18,0	+5,5	18,0	27,3	+9,3	+14,8
4 % Harnstoff	18,8	22,6	+3,8	26,3	32,9	+6,6	+10,4
6 % Harnstoff	20,1	24,9	+4,8	29,3	33,6	+4,3	+9,1
8 % Harnstoff	20,5	25,5	+5,0	29,2	33,1	+3,9	+8,9
10 % Harnstoff	25,0	28,7	+3,7	28,8	32,6	+3,8	+7,5