

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 870198 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 870198

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A23K 1/14
A23K 1/00
A23L 1/28

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 19.01.1987

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 19.01.1987

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 18.10.1987

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.04.1986 HU 1600/86

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Tatabanyai Szenbanyak**, Pf. 323, Tatabanya, TOWN UNKNOWN, UNKARI, (HU)

2 • **Agrartudományi Egyetem**, Deák F. u. 16 Keszthely, Hungary, UNKARI, (HU)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Adam, Robert**, Hungary, UNKARI, (HU)

2 • **Balint, Sandor**, Hungary, UNKARI, (HU)

3 • **Bornemisza, Endre**, Hungary, UNKARI, (HU)

4 • **Czencz, Ferenc**, Hungary, UNKARI, (HU)

5 • **Korcyl, Bela**, Hungary, UNKARI, (HU)

6 • **Korda, Rudolf**, Hungary, UNKARI, (HU)

7 • **Kubo, Sandor**, Hungary, UNKARI, (HU)

8 • **Palocz, Laszlo**, Hungary, UNKARI, (HU)

9 • **Schmidt, Janos**, Hungary, UNKARI, (HU)

10 • **Szigeti, Jenő**, Hungary, UNKARI, (HU)

11 • **Toth, Mihaly**, Hungary, UNKARI, (HU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä korkean proteiini- ja vitamiinipitoisuuden ja erinomaisen 20%-n kuiva-ainepitoisuuden omaavarehuraaka-aineen valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av ett foderråämne med hög protein- och vitaminhalt och utmärkt 20%-ig torrämneshalt.

Menetelmä korkean proteiini- ja vitamiinipitoisuuden ja yli 20%:n kuiva-ainepitoisuuden omaavan rehuraaka-aineen valmistamiseksi

5

Keksinnön kohteena on maataloudessa eläinten ruokintaan käytetyn, runsaasti tärkkelystä sisältävän rehun proteiini- ja vitamiinipitoisuuden kohottaminen siten, että rehusta, juomasta, jonka kiintoainepitoisuus on
10 yli 20%, pilkotaan tärkkelys, jonka pitoisuus on 120 - 150 % suurempi kuin toivottu proteiinipitoisuuden kasvu, vihermallaslietteen sisältämien entsyymien avulla käymiskelpoisiksi sokereiksi, minkä jälkeen lisäämällä epäorgaanisia ravintosuoloja valmistetaan käymisliuos ja
15 käymisliuoksessa fermentoidaan leivontahiivaa niin, että tuotteen alkoholipitoisuus on alle 0,1 %.

Karjanhoitomme tärkeimpiä ongelmia on se, että kotimainen kasvinviljely ei ole pitkään aikaan pystynyt täyttämään karjakannan proteiinin tarvetta. Kun ottaa
20 huomioon, että märehitjät pystyvät tyydyttämään proteiinitarpeensa myös NPN-aineilla, proteiininpuute koskee pääasiassa yksivatsaisia eläimiä. Proteiininpuutteen helpottamiseksi tuodaan joka vuosi noin 550 000 tonnia proteiinipitoista rehua varsinkin uutettuna soijarouheena.
25 Aiempina vuosina käynnistettiin laaja tutkimustointa, jonka tarkoituksena oli voida korvata proteiinitoinen tuontirehu kotimaisilla tuotteilla, ja niinpä esim. unkarilaiset HU-patenttijulkaisut 174262, 151207, 175538, 181771, 152696, 179332, 178342 ja 165381 käsittelevät kotimaista proteiinirehutuotantoa.
30

Yksi mahdollisuus vähentää proteiininpuutetta tai korvata uutettu soijarouhe on yksisoluproteiinien (SCP) valmistus. Yksisoluproteiineissa arvokkaan proteiinilähteen muodostavat hiivan proteiinit, joiden aminohappokoostumus on lähes samanlainen kuin uutetun soijarouheen
35

aminohappokoostumus, ja niitä voidaan käyttää erityisesti sikojen rehuna.

- 5 Lysiinipitoisuus (tämä aminohappo on tavallisesti ensimmäinen rajoittava sianrehun aminohappo) on vielä korkeampi kuin uutetun soijarouheen pitoisuus. Tavallisten rajoittavien aminohappojen suhteen (lyysiini, metioniini, treoniini, tryptofaani) hiiva kestää vertailun myös eläinten sekoitettujen proteiinijauhojen kanssa.

- Leipomohiivan yleinen kemiallinen koostumus on
- 10 kuiva-aineena laskettuna seuraava:
- | | |
|------------------------|---------------------------|
| Kuiva-ainetta | 1000 g |
| Raakaproteiinia | 560 g |
| Raakarasvaa | 20 g |
| Raakakuitua | 10 g |
| 15 Raakatuhkaa | 90 g |
| Typetöntä uutetta | 320 g/kg kuiva-ainetta |
| Ruansulatusenergia | 11,44 MJ/kg kuiva-ainetta |
| Aineenvaihduntaenergia | 15,85 MJ/kg kuiva-ainetta |

- 20 Sika voi sulattaa erinomaisesti hiivan sisältämän raakaproteiinin ja typettömät uutettavissa olevat aineet. Ravintoaineiden sulavuus sialla on seuraava:

- | | |
|------------------|------|
| Orgaaninen aines | 89 % |
| Raakaproteiini | 90 % |
| Raakarasva | 10 % |
| 25 Raakakuitu | - |
| Typetön uute | 95 % |

- 30 Hiiva on erinomainen B-ryhmään kuuluvien vitamiinien lähde, mikä on erittäin edullista yksivatsaisille eläimille. 1 kg:ssa hiivaa olevassa kuiva-aineessa on seuraavat vitamiinimäärät:

- | | | | |
|-----------------|--------|------------------|---------|
| Tiamiinia | 190 mg | Pantoteenihappoa | 102 mg |
| Riboflaviinia | 25 mg | Biotiinia | 0,8 mg |
| Pyridoksiinia | 45 mg | Foolihappoa | 26,0 mg |
| Nikotiinihappoa | 500 mg | Koliinia | 3,8 mg |

- 35 Edellä olevista tiedoista käy selvästi ilmi, että

hiiva on arvokas, ruokinnassa erittäin käyttökelpoinen proteiininlähde.

Edellä oleva tietäen suoritettiin kaikkialla maailmassa kokeita yksisoluproteiinien valmistamiseksi, minkä yhteydessä lukuisat menetelmät rehuhiivaksi sopivien erilaisten hiivalaatujen valmistamiseksi on kehitetty.

Tähänastisissa kokeissa fermentoitiin hiivakantoja *Saccharomyces*, *Torula* tai *Candida*.

Suurin osa menetelmistä perustuu alkoholin valmistuksessa käytettyihin melassiraaka-aineisiin. Kaikissa tähän asti tunnetuissa menetelmissä fermentaation lopputuote, hiiva, kuivataan ja käytetään.

Fermentaation raaka-aineen, melassin tai muiden fermentaatiossa välittömästi käytettävien sokeripitoisten maatalouden jätteiden varastointikustannukset, näin saadun rehuhiivan kuivauskustannukset, fermentaation steriilit olosuhteet sekä hiivan kuljetus- ja varastointikustannukset saavat aikaan rehuhiivan tuotantokustannukset.

Menetelmää kehittäessämme olemme asettaneet päämääräksi saada yllä mainitut kustannukset pienemmiksi kuin ne kustannukset, jotka syntyvät uutetun soijarouheen käyttöpaikalla.

Karjanruokintakokeissa olemme havainneet, että elävillä hiivasoluilla rikastettua, noin 14 % proteiinia sisältävää märkäruokinnassa käytettävää rehua (juoma) voidaan käyttää erittäin hyvin yksivatsaisten eläinten ruokintaan. Tästä kävi ilmi, että yksisoluproteiinin fermentoimiseksi käytetään hiili- ja energialähteenä ruokintaan käytetyn rehun seosta niin, että jauhetusta viljasta vapautetaan entsyymien avulla vesiliukoiseksi muuttunut fermentaatiossa välittömästi käyttökelpoinen sokeri. Näin saatu sokeripitoinen liete muutetaan sinänsä tunnettujen epäorgaanisten ravintosuolojen (N, P, K jne.) sekä hivenaineiden avulla *Saccharomyces*-sukuun kuuluvien sienien

fermentointiin sopivaksi käymislietteeksi.

Jos nyt entsyymien avulla suoritettu tärkkelyksen hydrolyysi suoritetaan niin, että yksisoluproteiinin, joka tarvitaan ruokintaan käytetyn rehuseoksen proteiinipitoisuuden täydentämiseksi, vesiliukoisen sokerin pitoisuus on turvattu, käymisliuos voi muodostaa ruokintaan käytetyn rehun (juoman) raaka-aineen, jota voidaan täydentää tarvittavilla vitamiineilla, esiseoksilla ja muilla ruokinnan apuaineilla.

Yksisoluproteiinin tuotantokustannusten alentamiseksi fermentaatioprosessin yksityiskohtia täytyy modifioida.

Yleisesti käytetyn, laimeassa happamassa liuoksessa suoritettun hydrolyysin sijasta olemme suorittaneet hydrolyysin entsyymien avulla matalassa (40 - 60 °C) lämpötilassa. Hydrolyysissä jätettiin tärkkelyksen hienontaminen suorittamatta höyrykäsittelyn vuoksi, ja entsyymimenetelmään käytettiin maltaan tai vihermaltaan suspensiota.

Kokeiden kuluessa pystyimme osoittamaan, että maltaan tai vihermaltaan 0,1 - 5 %:sella (ilmakuivattu) vesisuspensiolla, jonka pitoisuus on laskettu käymisliuoksen kuiva-aineen suhteen, voidaan saada aikaan erinomainen 20 % kuiva-ainetta sisältävä seos, jonka pH-arvo on 5,5 - 6,5 ja joka sisältää 10 - 30 g/l vesiliukoista, fermentaatiossa välittömästi käytettävää sokeria, jonka avulla voidaan valmistaa vähintään 5,5 - 20 g/l kuivahiivaa sisältävä käymisliuos.

Menetelmässä käytettäväksi olemme valinneet *Saccharomyces cerevisiae*-kannan huolimatta suuren alkoholipitoisuuden vaarasta, koska tätä on kaupan leipomohiivana.

Kokemukset ovat osoittaneet, että suoritettaessa puolijatkuva fermentaatio ammattikirjallisuudesta tunnetulla tavalla käyttämällä 0,5 - 1 mg/l liuennutta happea sisältävää käymisliuosta pH-alueella 5,5 - 6,5 suljetussa

fermentorissa ja suodatettua mutta ei steriiliä ilmaa es-
tetään infektoituminen patogeenillä bakteeriperäisellä
villihiivalla, jos *Saccharomyces*-pesäkkeiden määrä fer-
mentaation yhteydessä on varmasti yli 10^6 /ml. Myös muissa
5 kuin steriileissä olosuhteissa alkoholipitoisuus voidaan
pitää alle 1 %:ssa. Jos fermentaatio kestää pitkään, in-
fektoituminen maitohappobakteereilla voi tapahtua, mikä
huomataan pH-arvon alenemisesta ja maitohappopitoisuuden
noususta.

10 Tällä perusteella on mahdollista, että leipomohii-
van valmistusteknologiasta hyvin tunnettu ymppihiivan
valmistusprosessi ja siinä tarvittavat laitteet voidaan
jättää pois, kun käytetään kahta fermentoria ja suorite-
taan puolijatkuva fermentointi.

15 Mikäli tapahtuu infektoitumista, saatetaan vara-
fermentorissa käyntiin uusi fermentaatio, jonka yhteydes-
sä fermentorin pesäkkeiden lukumäärä kohotetaan arvoon
 10^6 /ml ymppäämällä leipomohiivasta valmistetulla suspen-
siolla.

20 Käyttämällä keksinnönmukaista menetelmää ja esi-
tettyjen tietojen perusteella sekä käyttämällä yleisesti
tunnettuja valmistusteknisiä perusmenetelmiä voidaan saa-
vuttaa seuraavat edut:

Esittämällämme menetelmällä voidaan kustannuksia
25 säästää vähentää proteiinin puutetta. Käyttämällä esi-
tettyä menetelmää voidaan tehdä mahdolliseksi hiivan fer-
mentointi steriileissä olosuhteissa käytön läheisyydessä,
jolloin päivittäin fermentoitu tuote käytetään märkäruo-
kinnassa ilman pitkäaikaista varastointia.

30 Fermentoidun rehun korkea vitamiinipitoisuus tekee
mahdolliseksi ruokinnassa käytettyjen, maahantuotujen vi-
tamiinivalmisteiden määrän vähentämisen.

Hiilen- ja energianlähteenä käytetään rehua, jolla
on suuri tärkkelyspitoisuus ja joka edustaa karjatalouden
35 suuryrityksissä suurinta osaa käytetystä rehuseoksesta,

jolloin fermentoinnin hiilenlähteen raaka-aineen (melassin tai muiden jätteiden varastointi) varastointikustannukset ovat turhia.

Keksinnön mukainen menetelmä tekee steriilin fermentoinnin tarpeettomaksi, ei ole välttämätöntä suorittaa tärkkelyksen hydrolyysiä korkeassa lämpötilassa eikä sterilisoiva yksikkö ole tarpeen. Puolijatkuva fermentaatioteknologia eliminoi steriilin lisäämisen hiivankasvatuksen yhteydessä; edelleen on tarpeetonta hankkia kaksitai useampivaiheinen systeemi ympyhiivan valmistamiseksi ja käynnissä pitämiseksi, koska fermentaation käynnistyksessä käytetään kauppatavarana saatavaa leipomohiivaa.

Fermentaatiossa käytetään maatalouden suuryrityksissä käytettävissä olevia aineita (poikkeuksena vesiliukoiset ravintosuolat), jolloin voidaan saavuttaa merkittävä kustannusten säästö kuljetuksessa ja liikevaihdossa, kun fermentaatiotuotteet voidaan käyttää ruokintaan välittömästi.

Valmistettaessa nesteruokintaan sopivaa rehuraakaainetta, jolla on suuri proteiini- ja vitamiinipitoisuus, on keksinnön mukaisesti tarkoituksenmukaista menetellä niin, että rakeinen jauhettu vilja, jonka raekoko on 2 mm ja tärkkelyspitoisuus suuri, tai C.C.M. tai soseutettu peruna laimennetaan suhteessa 1 : 4 vedellä, jonka lämpötila on 40 °C, jolloin litra vettä sisältää seuraavat liuenneet suolat:

	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	5,7	g/l
	Urea	4,2	g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g/l
30	KCl	0,2	g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005	g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005	g/l
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,002	g/l

Sekoittimella varustetussa hydrolyysisäiliössä lämpötilan hieman kohotessa kohotetaan pH arvosta 3,8 ar-

voon yli 5,5 lisäämällä 20 % NH_4OH :n vesiliuosta.

- Sen jälkeen sekoitussäiliöön johdetaan 20-%:sta mallassuspensiota, joka sisältää 2 g ohramallasta (litraa kohti käymisliuosta), minkä jälkeen hydrolyysiä jatketaan
5 3 tuntia samalla voimakkaasti sekoittaen, jolloin lämpötila pidetään alueella 20 - 50 °C.

Fermentorin tilavuudesta täytetään 25 % vesijohtovedellä ja lisätään litraa kohti 20 g leipomohiivaa E_{28} koko ajan sekoittaen ja ilmastaen.

- 10 Kun hydrolyysi on jatkunut 3 tuntia, sokeripitoinen käymisliuos, joka on jäädytetty, siirretään fermentoriin ja fermentoidaan lämpötilassa 25 - 35 °C pH-alueella 5,5 - 6,5 käyttäen liuenneen hapen ylimäärää 2 mg/l ja ilmastusta.

- 15 Kun fermentori on täytetty, otetaan joka kolmas tunti pois valmista tuotetta, jonka määrä vastaa hydrolysointifermentorissa olevan käymisliuoksen määrää, minkä jälkeen hydrolysoitu käymisliuos siirretään fermentoriin.

- 20 Erissä otetun käymisliuoksen kuiva-aineen proteiinipitoisuus on 4 - 5 % suurempi kuin raaka-aineen todellinen proteiinipitoisuus.

Fermentointia jatketaan niin kauan, että tuotteen maitohappopitoisuus on yli 1 % ja/tai alkoholipitoisuus yli 0,5 %.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä suuren proteiini- ja vitamiinipitoi-
5 suuden ja yli 20 %:n kuiva-ainepitoisuuden omaa-
van rehuraaka-aineen valmistamiseksi suuren tärkkelyspi-
toisuuden omaavista maataloustuotteista, t u n n e t t u
siitä, että vastaava määrä suuren tärkkelyspitoisuuden
omaavaa ainetta hydrolysoidaan lämpötilassa 40 - 60 °C
10 suspension kanssa, joka sisältää käymisliuoksen kuiva-ai-
neesta laskettuna 0,1 - 5,0 % vihermallasta tai mallasta,
mono- tai disakkaridiksi ja näin käsiteltyssä, yli 20 %
kuiva-ainetta sisältävässä ravintosuoloilla täydennetyssä
käymisliuoksessa fermentoidaan leipomohiivaa (*Saccharomy-*
15 *ces cerevisiae*) pH-alueella 5,5 - 6,5 lämpötilassa 25 -
35 °C käyttäen puolijatkuvaa fermentaatiota.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että entsyymien avulla suoritettu
tärkkelyksen hydrolyysi suoritetaan fermentaatiotilasta
20 erillään siten, että käymisliuoksessa välittömästi fer-
mentoitavissa olevan sokerin kokonaismäärä on vähintään
120 %, tarkoituksenmukaisesti 150 % suurempi kuin toivot-
tu proteiinipitoisuuden kasvu.

3. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että ympäyrykseen käytetään kaup-
patavarana saatavaa hiivaa ja ympäyry suoritetaan liete-
tyllä hiivalla sokeroitumisprosessin jälkeen niin, että
käymisliuoksen hiivapesäkkeiden määrä on vähintään
10⁶/ml.

30 4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että puolijatkuvassa fer-
mentoinnissa käytetään kahta rinnakkaista toiminnassa
olevaa fermentoria, jolloin mahdollisen bakteeri-infek-
tion yhteydessä fermentointi keskeytetään, jos käymis-
35 liuos sisältää maitohappoa yli 1 % tai alkoholia yli

0,5 %, minkä jälkeen fermentori desinfioidaan kemikaaleilla.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fermentointi suoritetaan suljetuissa fermentoreissa, alkoholikäyminen
5 käyttäen ilmamäärää, joka on alle 0,1 %, ja fermentointiin käytettävä ilma ainoastaan suodatetaan.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytettäväksi tulevista maataloustuotteista vihermaltaan raaka-aineena
10 oleva ohra pehmennetään etukäteen ennen idätystä steriloitineesteessä.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

H 781607 (A23K 1/12)

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH P 595 049 (A23K 1/00)

DE

DK

FR

GB P 1 366 095 (A23K 1/14), P 1 418 936 (A23K 1/00),
P 2 090 514 (A23K 1/12)

NO

SE P 423 026 (A23K 1/00)

US

EP

WO

SU 232185 (C12k)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Maiga Tamminen

Allekirjoitus