РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG (11) 60635 B1

5(51) A 23 K 3/00

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 97480
(22) Заявено на 25.02.93
(24) Начало на действие на патента от: 27.08.91

Приоритетни данни

(31) 9019024 (32) 31.08.90 (33) GB

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 на 24.03.94
(45) Отпечатано на 29.03.96
(46) Публикувано в бюлетин № 11 на 30.11.95
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентопритежател(и):
ZENECA Limited, London (GB)

(72) Изобретател(и):
Jane Ann Wetherall, Rowland Gill
John Andrew Rooke, Aberdeen (GB)

(74) Представител по индустриална собственост:
Георги Цветанов Перев, 1124 София, ул. "Леонардо Да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/GB91/01438, 27.08.91

(87) № и дата на PCT публикация:
W092/03933, 19.03.92

(54) СИЛАЖНА ДОБАВКА

(57) Добавката намира приложение при производството на силажи от треви, зърнени храни, бобови растения и ориз. С нея се подобрява съхранението, повишава се устойчивостта на силажния продукт, понижават се загубите и се улеснява усвояването на силажа от животните. В силажната добавка са включени активен компонент за силажирането на културите и най-малко един инхибитор на ензимна протеаза, подбран от цистеинпротеазните и аспарагинпротеазните инхибитори. Активният компонент може да бъде химическо вещество като киселина или от бактериален произход, например продуциращи млечна киселина щамове. Инхибиторите са с биологичен произход. Силажната добавка може да се прилага под формата на течност или раздробено твърдо вещество, като в двата случая носителите са различни.

16 претенции

BG 60635 B1

(54) СИЛАЖНА ДОБАВКА

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до силажна добавка и до метод за получаване на силаж.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Силаж се получава чрез ферментация на култури, такива като треви, зърнени култури като царевица, жито, ечемик, сорго, бобови, например детелина, грах, люцерна и ориз. В най-простата си форма, ферментацията е естествена и се причинява от продуциращи млечна киселина, бактерии, намиращи се в растителни култури при тяхното прибиране. Ферментацията може обаче да се подобри чрез прибавянето на силажни добавки, които са химически или бактериални, т.е. съдържащи подбрани бактерии, продуциращи млечна киселина. Използването на такива силажни добавки подобрява съхранението и повишава устойчивостта на силажния продукт, като се понижават загубите в силажните ями и се обяснява усвояването на продукта от хранени с него животни. Силажните добавки могат да се внасят в събраните растителни култури или като течни суспензии, при използване на подходящи устройства или като твърди състави, представляващи активен компонент, смесен с носители.

По време на силажирането, растителни протеини се хидролизират до пептиди и аминокиселини под въздействието на растителни протеази и след това се дезаминират вследствие на микробиалната активност. Затова азотсъдържащите съставки на силажа се състоят предимно от аминокиселини, пептиди с къси вериги и амоняк, за разлика от пашата, която съдържа приблизително 750-850 g истински протеинов азот /kg общ азот.

Силажният азот слабо се оползотворява като субстрат за микробиална протеинова синтеза в търбуха на преживните животни. Затова е необходимо силажът да се допълва със съпоструващи, богати на азот хранителни продукти като соево и рибено брашно.

До момента се знае малко за механизма, по който растителните протеини се хидролизират по време на силажирането на тревите. Желателно е обаче, хранителната стойност на силажа да се подобри чрез понижаването или отстраняването на протеолизата, която възниква по време на процеса на силажиране.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Съгласно изобретението се осигурява силажна добавка, съдържаща активен компонент за силажиране на културите и инхибитор на ензимна протеаза, подбран измежду цистеинпротеазните и аспарагинпротеазните инхибитори, като инхибиторът е от биологичен произход.

Освен това изобретението се отнася и до метод за получаване на силаж, при който растителните култури са силажирани в присъствието на поне един от споменатите инхибитори.

Цистеин и аспаргинпротеазите могат да бъдат идентифицирани съгласно указанията на Storey and Wagner /1/, в съответствие с препоръките на IUPAC-IUB.

За предпочитане е да се използва инхибитор на цистеинпротеазни ензими.

В силажната добавка съгласно изобретението, може да бъде включен всеки подходящ активен компонент. Той може да бъде химическо вещество, например киселина (мравчена или сярна или техни смеси) или компонент от бактериален произход. Последните са много подходящи и включват продуциращите млечна киселина щамове на Lactobacillus, Streptococcus, и Pediococcus acidilactici и Pediococcus pentosaceus, по-специално на Lactobicillus plantarum. Особено полезен за силажиране на множество растителни материали е щамът Lactobacillus plantarum MTD1, образец от който е депозиран в National Collections of Industrial and Marine Bacteria /NC IMB/, 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 IRY, UK и е получил входящ номер № NCIMB 40027. Депозиран е на 12 ноември 1986 г. и е приет като депозит за патентни цели на 20 юли 1988, като международната регистрация съгласно Будапещенския договор е направена на 25 юли 1988. Други подходящи щамове са Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus caseii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus brevis, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Streptococcus faecalis, Lactobacillus amylophilus, Streptococcus lactos, Streptococcus thermophilus

и по-специално Lactobacillus amylophilus щам № NCIMB 11546, Streptococcus lactis щам № NCIMB 6681 и Streptococcus thermophilus щам NCIMB № 8510. Тези щамове са известни.

Предпочитаните цистеинпротеазни инхибитори включват цистатини, антипен и по-специално пептидни епоксиди, като трансепоксисукцинил-L-левцил-амидо/4-гуанидино/бутан/Е-64/. В предпочитан вариант на изобретението, растителните култури, които трябва да се силажират, се обработват с аспарагинпротеазен инхибитор в добавка към цистеинпротеазния инхибитор, за да се получи повишен инхибиторен ефект. Подходящите аспарагинпротеазни инхибитори включват пепстатин А.

Е-64 може да се получи по метода на Hanada et al. [2]. Цистатинът е описана от Fossum et al в [3]. Неговото по-нататъшно пречистване и характеризиране е известно [4]. Антипенът е описан в [5 и 6]. Пепстатинът също е описан [7].

По метода съгласно изобретението, цистеинпротеазният инхибитор най-общо се прибавя към растителните култури като част от силажната добавка, заедно с активния компонент за силажирането на културите. Цистеинпротеазният инхибитор обаче може да се прибави отделно, преди или след активния компонент. В много случаи се предпочита цистеинпротеазният инхибитор да се прибави към прясно нарязаната трева, преди да бъде силажирана. Когато се използват цистеин- и аспарагинпротеазни инхибитори, за предпочитане е те да се прилагат едновременно.

За предпочитане цистеинпротеазният инхибитор се прилага към културата, която ще бъде силажирана, в количество в границите от 10 до 130 μmol/kg култура при pH от 3 до 7,5. Когато инхибиторът се прилага заедно с аспарагинпротеазен инхибитор, най-подходящо е двата материала да се влагат заедно, въпреки, че е възможно също да се прибавят поотделно в каквато и да е ред.

За предпочитане аспарагинпротеазният инхибитор се прилага в количество от 1 до 60 mg/kg култура. Подходящо е силажирането да се осъществява при условия, при които достъпът на кислород е ограничен или изключен.

Силажната добавка съгласно изобретението може да се прилага под формата на течност или на раздробено твърдо вещество. Когато тя се прилага под формата на течност, носителят е вода и евентуално нисш алкохол, например пропан-1-ол. Когато се прилага под формата на твърдо вещество, носителят е твърд материал. Обикновено добавките, прилагащи се като твърди вещества, се доставят като средства, включващи носителите. Когато добавката се прибавя под формата на течност, потребителят се снабдява с активния компонент, който трябва да бъде суспендира в подходящ обем вода преди употреба.

Когато силажната добавка съгласно изобретението се прилага като твърдо вещество, всеки подходящ материал може да бъде използван като носител. Подходящи носители са зърнени култури, като смлени царевични кочани, ечемик и жито и други материали, като варовик, глина, тебешир, магнезит и талк.

В допълнение към носителите, активните компоненти и цистеинпротеазните инхибитори, силажните добавки обикновено съдържат и други материали, прибавени по различни причини. Всеки допълнителен материал може да бъде включен като друг компонент в активната съставка съгласно изобретението. Допълнителните материали включват хранителни вещества /които могат да бъдат захари като захароза, лактоза и др./; растежни фактори, които са необходими за растежа на някои бактерии /включващи дрождев екстракт, царевичен, витамини и аминокиселини/; вещества добавяни, за да запазят жизнеспособността на бактериите, антиоксиданти; вещества спомагащи за поглъщане на кислорода; масла и други материали за понижаване разпрашаването на добавките или за подобряване на адхезията към растителните култури.

Относителните съотношения на носителя и на активния компонент, включени в силажната добавка, зависят от добавката и нейната активност.

Когато се използва под формата на твърдо вещество добавката съгласно изобретението е подходящо да се прибавя към фуража в дозировка в границите от 0,1 до 5 Kg/t от подлежащия на обработка фураж, за предпочитане в границите от 0,2 kg до 1 kg/t. Когато се прилага под формата на течност добавката, съгласно изобретението е подходящо да се прибавя в количество от 0,5 до 5 l/t обработван фураж, като активният компонент се прибавя към водата в количество от 1 до 100 g/l. Всяко

подходящо устройство може да се използва за прилагане на добавката.

Силажната добавка съгласно изобретението може да се използва при приготвяне на силаж от всеки подходящ материал, включително растителните култури, изброени по-горе в това описание. Тя обаче е изключително подходяща за силажиране.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението се илюстрира със следните примери:

Пример 1 /диагностичен/.

Екстракти от Райграс се пречистват 60-кратно чрез утаяване с амониев сулфат, гелно филтруване и йонообменна хроматография. Установено е, че така пречистени ензими са с хетерогенни активности, но въпреки това споделят подобни модели на инхибиране от различни протеазни инхибитори /таблица 1/. Значително инхибиране се установява само с р-хлормеркурибензоат, цистеинпротеазен инхибитор. Инхибиране също се установява, но в много по-малка степен, с пепстатин, инхибитор на аспарагин протеази. Не се установява инхибиране с фенилметилсулфонил флуорид, серин протеазен инхибитор. От тези данни може да се заключи, че основният клас протеази, налични в райгпраса, са цистеинпротеазите.

Таблица 1

Инхибитор	Ензим	Концентрация	Инхибиране
PCMB	Цистеин	ImM	100%
IODAA	Цистеин	1mM	10%
PMSF	Серин	1mM	2%
Пепстатин	Аспарагин	5 μg/ml	17%

Съкращения в таблица 1.

PCBM: Парахлормеркурибензоат, IODAA: йодоцетна киселина, PMSF: фенилметилсулфонил флуорид.

Пример 2.

Процедурата от Пример 1 се повтаря при използване на буферирани екстракти от райграс. Екстрактите се инкубират при различни стойности на pH в присъствието на смес от антибиотици, предназначени да предотвратят ферментация по време на периода на инкубиране. Използваните протеазни инхибитори са специфични към различни класове протеази и са предимно микробиални по произход. Резултатите са представени в Таблица 2. Инхибирането на автолизата е по-малко забележимо отколкото това, наблюдавано с полупречистените препарати от Пример 1. Обаче инхибиране пак се открива само при използване на Е-64 /специфичен цистеин протеазен инхибитор/ при пепстатина.

Таблица 2

Инхибитор	Ензим	Концентрация	pH	Инхибиране %
Е-64	Цистеин	10 μM	4	13
Пепстатин	Аспарагин	5 μg/ml	5	47
Апротинин	Серин	5,6 TIU	6	0
A-PMSF	Серин	130 μM	6	0

Съкращения в таблица 2

Е-64: транс-Епокси-сукцинил-L-левцил-амидо/4-гуанидино/ бутан, A-PMSF: /р-Амидинофенил/метилсулфонил флуорид, TIU:

Трипсин-инхибиторна единица.

Пример 3.

Многогодишен райграс /Сухо вещество / СВ/, 279 g/kg; Водоразтворим въглехидрат, 113 g/kg СВ; Общ азот 26,5 g азот/kgСВ; разтворим азот 433 g/kg СВ/ се силажира. Тревата се силажира със или без обработка с мравчена киселина /1,5 g/kg трева/ с цел силажиране на тревата при pH 6,25 или pH 5. Шест обработки /отразени в Таблица 3/ са приложени към тревата за всяка стойност на pH. Използват се четири различни протеазни инхибитори: E-64, цистеин-протеазен инхибитор; Пепстатин, аспарагин-протеазен инхибитор; воден екстракт от картофи, който съдържа серин- и цистеин-протеазни инхибитори; формалдехид, който понижава протеолизата посредством образуване на обратими напречни връзки между протеините. Зареждат се общо 36 силоза /силажни ями/, по три за всеки опит. Силозът представлява 100 мл-ов цилиндър, снабден с бунзенови клапани и по 70 g трева, заредена във всеки силоз.

Силозите се отварят след 82 дни. Всичко изглежда добре силажирано, без видим брак. Анализите на силажите са посочени в таблица 4 и 5.

Понижаването на pH на силажираната трева чрез използването на мравчена киселина оказва слабо влияние върху състава на силажа. Въпреки, че обработката с мравчена киселина има значително влияние върху концентрациите на млечна и оцетна киселина и етанола, тези разлики възникват поради лошото ферментационно качество на силажа, силажиран след обработка с мравчена киселина и с формалдехид. Причините за това не са ясни.

Протеазните инхибитори също имат малък ефект върху ферментацията на силажа. Когато се сравнява със силажите от необработените с формалдехид проби, прибавянето на картофен екстракт не влияе върху разграждането на протеините в силоза /Таблица 5/. Нито пък прибавянето на пепстатин при силажирането влияе върху качеството на силажа. Обаче, E-64 цистеин протеазният инхибитор, значително /$P < 0,001$/ понижава количеството на разтворимия азот /0,80 от контролния разтворим азот/ и на амонячния азот /0,73 спрямо амонячния азот на контролата/, получен по време на силажирането.

Резултатите от тези проучвания сочат, че цистеин-протеазите са основния тип протеази, свързани с разграждането на протеина в силоза, като прибавянето на специфични инхибитори от типа на цистеин-протеазните инхибитори, микробиални по произход, може да понижи степента на протеолизата, която се осъществява в силоза, без да повлияе неблагоприятно върху получаването на млечната киселина при това.

Таблица 3

Обработка	Концентрация
Вода	-
E-64	10 μM
Пепстатин	5 μg/ml
E-64 и Пепстатин	както по-горе
Картофен екстракт	неразреден екстракт
Формалин	3 g/kg трева

Таблица 4

Обработка	СВ	pH g/kg	BPB	Лак	Ац g/kgСВ	Ет
Силажиране при pH 6,2						
Контрола	249	3,75	30,1	120	24,3	5,37
E-64	244	3,76	30,6	115	22,7	3,15

Пепстатин	239	3,75	30,2	126	22,2	9,26
Е-64 + Пепстатин	247	3,76	30,1	111	22,5	2,56
Картофи	244	3,72	30,0	124	23,1	7,22
Формалдехид	254	3,76	29,6	115	20,8	2,67
Силажиране при pH 5,0						
Контрола	250	3,69	30,2	124	22,1	0,5
Е-64	249	3,72	30,2	115	19,6	0,92
Пепстатин	251	3,72	29,9	115	21,0	0,5
Е-64 + Пепстатин	247	3,80	30,9	102	17,5	2,25
Картофи	247	3,74	30,8	110	24,2	13,7
Формалдехид	252	4,49	29,7	51	19,3	18,5
СГ	0,5	0,086	0,60	7,0	1,16	1,06

Съкращения в Таблица 4

СГ: Стандартна грешка от 6 наблюдения; Лак: Лактат; Ац: Ацетат; Ет: Етанол; ВРВ: Водоразтворим въглехидрат.

Таблица 5

Обработка	Общ N /gN/kgCB/	Разтворим N /gN/kgN/	Амонячен N /gN/kgN/
Силажиране при pH 6,2			
Контрола	26,9	535	88,5
Е-64	26,3	424	68,3
Пепстатин	27,1	547	79,6
Е-64 + Пепстатин	26,8	454	54,5
Картофи	24,4	524	86,9
Формалдехид	24,4	528	85,6
Силажиране при pH 5,0			
Контрола	22,1	520	85,3
Е-64	27,4	357	59,1
Пепстатин	25,3	597	75,8
Е-64 + Пепстатин	26,5	414	49,6
Картофи	27,1	522	68,2
Формалдехид	26,7	518	100,8
СГ	0,49	2,4	0,48

Съкращения в Таблица 5

СГ: Стандартна грешка от 6 наблюдения.

Пример 4.

Многогодишен райграс се нарязва на парчета с дължина около 2 sm и се залива с 20 ml вода или воден разтвор, описан по-долу, на 70 g трева. Сместа се притиска и пакетира в затворени силози, запечатани срещу достъп на въздух, които се поддържат при стайна температура по време на опита. Райграсът е със сухо вещество 190 g/kg, водоразтворими въглехидрати 241 g/kg сухо вещество, общо съдържание на азот 42,5 g/kg сухо вещество и съдържание на водоразтворим азот 487 g/kg азот. Останалото количество азот е представено главно под формата на протеин. 20 ml вода или разтвор, съдържащ достатъчно от ензимния инхибитор и/или от бактериалния препарат, е предназначен да достави количествата в μg/g прясна трева, посочени в таблица 6.

Таблица 6

Обработка	Концентрация	
	µg/g прясна трева	µm/g прясна трева
Вода/Контрола/	-	-
E-64	11,25	0,03
	22,5	0,06
	45,0	0,12
Пепстатин	30,0	0,04
	/Пепстатин/ /E-64/	
Пепстатин + E-64	30,0 22,5	0,04 0,06
Антипен	32,0	0,04
Цистатин	1,2	0,9
"ECOSYL"	3 l/t /2,85 g/l/	
"ECOSYL"+E-64	"ECOSYL", приложен в горепосочената доза E-64 приложен в доза 22,5 g/g трева	

"ECOSYL" е търговски достъпна силажна добавка за водна суспензия, производство на ICI PLC. "ECOSYL" е търговска марка на ICI PLC.

Продуктът включва като основен активен компонент изсушен чрез замразяване L. plantarum щам NCIMB 48027 заедно с хранителни вещества. Всички обработки се осъществяват трикратно. Силозите се отварят след 50 дни и всичко изглежда добре силажирано, без видими дефекти. Пепстатинът е аспарагин протеазен инхибитор. Антипенът е инхибитор на цистеин и серин-протеази и цистатинът е инхибитор на цистеин-протеази. Предполага се, че те се свързват еквимолекулярно с протеазите.

В следващите таблици непротеиновият азот /разтворим азот/ не включва амоняк. СГ означава стандартна грешка и във всяка таблица е за три наблюдения; Ла - лактат; Ац - ацетат и Ет - етанол. Лактатът и ацетатът са изразени като свободни киселини. Изследването на продуктите от силажирането сочи, че протеазните инхибитори имат слаб ефект върху силажната ферментация и производството на млечна киселина не е повлияно. В следващите таблици СВ означава сухо вещество.

Таблица 7

Влияние на повишаването на концентрациите на E-64 върху азотните фракции на силажа

E-64 Концентрация µg/g трева	Общ N gN/kgCB	Не-белтъчен N gN/kgN	Амонячен N gN/kgN
0	407	643	72,4
11,25	360	558	61,1
22,5	366	586	70,8

45,0	359	481	51,0
СГ	0,89	2,22	0,71

СГ: стандартна грешка от три наблюдения. Небелтъчният N не включва амонячния N.

За силажа, обработен с Е-64 в доза 11,25 μg/g трева, разтворимият азот /небелтъчен N/ се понижава до 87% спрямо съдържанието на азот в контролната проба. За силажа, обработен с Е-64 при доза 45,0 μg/g трева, съдържанието на разтворим азот се понижава до 75% спрямо количеството разтворим азот в контролната проба. Съдържанието на амонячен азот в силажа, обработен с Е-64 при доза 45 μg/g трева, се понижава до 70% спрямо това на амонячен азот в контролните проби.

Влияние на повишените конц. на Е-64 върху състава на силажа

Таблица 8

Е-64 Доза на приложение	Силаж pH	СВ	ВРВ	Ла	Ац	Ет
0	3,48	156	20,6	184	22,4	16,0
11,25	3,41	158	24,5	202	19,3	38,9
22,5	3,48	163	24,2	188	22,2	33,3
45,0	3,40	164	31,3	175	18,4	35,5
СГ	0,02	0,15	1,25	13,5	2,94	5,57

СВ означава сухо вещество в g/kg и ВРВ означава водоразтворим "въглехидрат"; Ла - млечна киселина; Ац - оцетна киселина; Ет - етанол; Всички величини са изразени в g/kg сухо вещество.

Под сухо вещество се разбира остатъкът след дехидратиране на тревата или силажа, в зависимост от случая.

Таблица 9

Влияние на Е-64 и пепстатина върху състава на силажа

Обработка	Общ N gN/kgCB	Небелтъчен N gN/kgN	Амонячен N gN/kgN
Контрола	407	643	72,4
Е-64 22,5 μg/g трева	366	556	70,8
Пепстатин 30 μg/g трева	435	521	60,6
Е-64 /30 μg/g трева/ и Пепстатин /22,5 μg/g трева/	428	438	62,9
СГ	1,51	0,63	0,54

Пепстатинът понижава количеството на разтворимия азот /81% спрямо този в контролата/. Понижаването на количеството на разтворимия азот в силажите е по-голямо при прилагане на пепстатин съвместно с Е-64, отколкото при приложение на всеки от инхибиторите поотделно. За силажите, обработени с пепстатин заедно с Е-64, съдържанието на разтворим азот е понижено до 68% спрямо това в контролата.

Таблица 10

Влияние на Е-64 и Пепстатин върху състава на силажа

Обработка	Силаж pH	СВ	ВРВ	Ла	Ац	Ет
Контрола	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
Е-64 22,5 μg/g трева	3,48	163	24,2	188	22,2	33,3
Пепстатин 30 μg/g трева	3,61	164	17,5	168	16,1	36,0
Е-64 30 μg/g трева и Пепстатин 22,5 μg/g трева	3,56	163	11,1	171	23,9	38,9
СГ	0,02	0,12	0,66	8,48	5,39	8,68

Таблица 11

Влияние на цистеин протеазните инхибитори върху азотните фракции на силажа

Обработка	Общ N gN/kg СВ	Небелтъчен N gN/kgN	Амонячен N gN/kgN
Контрола	407	643	72,4
Е-64 22,5 μg/g трева	366	556	70,8
Цистатин 1,2 μg/g трева	406	571	75,7
Антипен 32 μg/g трева	411	524	69,1
СГ	1,02	2,40	0,76

Съдържанието на разтворим азот при силажи, обработени с цистатин, се понижава до 88% спрямо разтворимия азот в контролата.

Съдържанието на азот в силаж, обработен с антипен, се понижава до 81% спрямо разтворимия азот в контролата.

Таблица 12

Влияние на Цистеин протеазните инхибитори върху състава на силажа

Обработка	Силаж pH	СВ	ВРВ	Ла	Ац	Ет
Контрола	3,48	156	20,5	184	22,5	10,0
Е-64 22,5 μg/g трева	3,48	163	24,2	190	22,2	33,3
Антипен 32 μg/g трева	3,55	161	24,1	163	28,8	4,31
Цистатин 1,2 μg/g трева	3,65	160	17,2	183	29,4	4,55
СГ	0,03	3,09	0,93	19,2	8,57	5,07

Таблица 13

Влияние на Е-64 и "Ecosyl" върху азотните фракции на силажа

Обработка	Общ N gN/kg СВ	Небелтъчен N gN/kgN	Амонячен N gN/kgN
Контрола	407	643	72,4
Е-64, 22,5 μg/g трева	366	586	70,8
"ECOSYL" 8,55 μg/g трева	378	533	63,2
Е-64 22,5 μg/g трева и "ECOSYL" 8,55 g/l	355	421	53,3
СГ	0,79	1,51	0,79

За обработения с "Ecosyl" силаж количеството на разтворим азот се понижава до 82% спрямо разтворимия азот на контролната проба. За силажа, обработен с Е-64 и "Ecosyl", се наблюдава голямо понижение на съдържанието на разтворим азот, сравнено с постигнатото при всяка от обработките поотделно. При прибавянето на "Ecosyl", заедно с Е-64, съдържанието на разтворим азот на силажа спада до 65% спрямо това на контролата.

Таблица 14

Влияние на Е-64 и "Ecosyl" върху състава на силажа

Обработка	Силаж pH	СВ	ВРВ	Ла	Ац	Ет
Контрола	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
Е-64 22,5 μg/g трева	3,48	163	24,1	188	22,2	33,3
"ECOSYL" 8,55 μg/g трева	3,63	154	16,0	149	42,5	11,2

"ECOSYL" 8,55 μg/g трева и E-64 /22,5 μg/g трева/	3,45	164	28,9	132	42,0	30,2
СГ	0,03	0,11	0,92	13,9	8,53	5,45

Заключения

Резултатите сочат, че цистеин и аспарагин протеазите са активни по време на силажирането. Прибавянето на специфични цистеин и аспарагин протеазни инхибитори от биологичен произход понижава степента на протеолиза в силоза, без да повлияе неблагоприятно на продукцията на млечна киселина в силоза.

Намаляването на съдържанието на разтворим азот в силаж, обработен с "Ecosyl", в сравнение с това на контролните силажи, може да се отдаде на влиянието на pH върху протеолитичните ензими на райграса /които е установено, че са оптимално активни при pH от 5 до 7/; по-бързото понижаване на pH по време на първоначалните етапи на силажирането трябва да се очаква за обработените с "Ecosyl" силажи в сравнение с контролните проби силаж.

Комбинирането на цистеин и аспарагин протеазни инхибитори или на цистеин протеазен инхибитор с "Ecosyl" показва понижение на протеолизата в силоза в по-голяма степен, отколкото при обработките с едно средство.

Патентни претенции

1. Силажна добавка, характеризираща се с това, че включва активен компонент за силажирането на културите и най-малко един протеазен ензимен инхибитор, избран измежду цистеин протеазните инхибитори и аспарагин протеазните инхибитори, като инхибиторът е от биологичен произход.

2. Силажна добавка съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че активният компонент е киселина или вещество от бактериален произход.

3. Силажна добавка съгласно претенции 1 и 2, характеризираща се с това, че бактериалният компонент е продуциращ млечна киселина щам на Lactobacillus и/или Streptococcus и/или Pediococcus.

4. Силажна добавка съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че цистеин протеазният инхибитор е цистатин, антипен или трансепокси-сукцинил-L-левцил-амидо/4-гуанидино/бутан.

5. Силажна добавка, съгласно претенции 1 и 4, характеризираща се с това, че трансепокси-сукцинил-L-левцил-амидо/4-гуанидино/бутанът е получен по известен в [2] начин.

6. Силажна добавка съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че аспарагин протеазният инхибитор е пепстатин.

7. Силажна добавка съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че включва едновременно цистеин и аспарагин протеазни инхибитори.

8. Силажна добавка съгласно претенции от 1 до 7, характеризираща се с това, че включва течен носител, който представлява вода.

9. Метод за получаване на силаж, характеризиращ се с това, че силажирането на културата се осъществява в присъствието най-малко на един протеазен ензимен инхибитор, избран измежду цистеин протеазен инхибитор и аспарагин протеазен инхибитор, като посоченият инхибитор е от биологичен произход.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че цистеин протеазният инхибитор се прилага към прясно нарязаната трева преди силажирането й.

11. Метод съгласно претенции 9 и 10, характеризиращ се с това, че цистеин протеазният инхибитор се прилага в количество от 10 до 130 μmol/kg култура.

12. Метод, съгласно претенции 9 до 11, характеризиращ се с това, че аспарагин протеазният инхибитор се прилага в количество от 1 до 60 mg/kg култура.

13. Метод, съгласно претенции 9 до 12, характеризиращ се с това, че при прилагане на инхибитора към културата pH се поддържа в границите от 3 до 7,5.

14. Метод, съгласно претенции 9 до 13, характеризиращ се с това, че течната добавка, която представлява протеазен инхибитор в количество от 1 до 100 g/l в носител, представляващ вода, се прилага в количество от 0,5 до 5 l/t обработван фураж.

15. Метод, съгласно претенции от 9 до 14, характеризиращ се с това, че силажът се получава чрез ферментация на треви, зърнени, бобови култури или ориз.

16. Силаж характеризиращ се с това, че е получен по метода по претенции 9 до 15 или чрез използване на добавката по претенции от 1 до 8.

Литература

1. Phytochemistry, 25, № 12, 2701-9 (1986).

2. Agric. Biol. Chem. 42, (3) 529-36 (1978).

3. Arch. Biochem. Biophys. 125, 367 (1968).

4. Arch. Biochem. Biophys. 158, 623 (1972).

5. J.Antibiotics. 25, 263, (1972).

6. J.Antibiotics. 25, 267, (1972).

7. J.Antibiotics. 23, 259, (1970).

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: М.Минева

Редактор: Е.Синкова

Пор. 37702

Тираж: 40 ЗС