(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 930896 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 930896

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A23K 3/03

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **27.08.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **26.02.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.02.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **27.08.1991 PCT/GB1991/001438**

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

31.08.1990 GB 9019024

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **ZENECA Limited,** Imperial Chemical House, 9 Millbank, London, SW1P 3JF, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Wetherall, Jane Ann,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)
2 • **Rooke, John Andrew,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Ensilagetillsats

Säilörehun lisäaine

Tämä keksintö koskee säilörehun lisäainetta ja menetelmää säilörehun tuottamiseksi.

Säilörehua tuotetaan fermentoimalla satoa kuten heinäkasveja; viljanjyviä, esim. maissia, vehnää, ohraa ja durraa; palkokasveja, esim. apiloita, herneitä ja sinimailasta; ja riisiä. Yksinkertaisimmassa muodossaan fermentaatio on luonnollinen fermentaatio, jonka saavat aikaan alkuperäiset sadossa sitä korjattaessa läsnä olevat maitohappoa tuottavat bakteerit. Fermentaatiota voidaan kuitenkin parantaa lisäämällä satoon säilörehun lisäaineita, jotka voivat olla kemiallisia tai bakteeriaineita, so. sisältävät valittuja maitohappoa tuottavia bakteereja. Tällaisten säilörehun lisäaineiden käyttö johtaa säilörehutuotteen parantuneeseen suojaamiseen ja suurentuneeseen stabiiliuteen, jolloin häviöt siilossa vähenevät ja eläinten, joille syötetään tuotetta, suorituskyky on parempi. Säilörehun lisäaineita voidaan lisätä korjattuun satoon joko nestemäisinä suspensioina, jotka lisätään käyttäen sopivia applikaattoreita, tai kiinteinä seoksina, jotka sisältävät aktiivisen aineosan sekoitettuna kantajaaineiden kanssa.

Säilörehun valmistuksen aikana kasviproteiineja hydrolysoituu laajasti peptideiksi ja aminohapoiksi kasviproteaasien vaikutuksesta ja myöhemmin deaminoituu mikrobien aktiivisuuden vaikutuksesta. Säilörehun typpipitoiset aineosat koostuvat sen vuoksi pääasiallisesti aminohapoista, lyhyistä peptideistä ja ammoniakista, päinvastoin kuin ruohossa, joka sisältää suunnilleen 750 - 850 g varsinaista proteiinityppeä/kg kokonaistyppeä.

Säilörehun typen käyttö substraattina pötsin mikrobien proteiinisynteesiä varten on heikkoa. Sen vuoksi on tarpeellista täydentää säilörehuruokavalioita kalliilla

runsaasti proteiinia sisältävillä ravintoaineilla kuten soijajauholla ja kalajauholla.

Tähän mennessä tiedetään vähän mekanismista, jonka avulla kasviproteiinit hydrolysoituvat ruohokasvien säilörehuksi valmistamisen aikana. On kuitenkin toivottavaa, että säilörehun ravintoarvoa parannetaan vähentämällä säilörehun valmistuksen aikana esiintyvää proteolyysiä tai poistamalla se.

Tämän keksinnön mukaiselle säilörehun lisäaineelle on tunnusomaista, että se sisältää aktiivisen aineosan säilörehun valmistamiseksi sadosta ja vähintään yhden proteaasientsyymien inhibiittorin, joka on valittu kysteiiniproteaasien inhibiittoreista ja asparagiinihappoproteaasien inhibiittoreista ja jo(t)ka inhibiittori(t) on (ovat) biologista alkuperää.

Lisäksi tämän keksinnön mukaan menetelmälle säilörehun tuottamiseksi on tunnusomaista, että sadosta valmistetaan säilörehua mainitun vähintään yhden inhibiittorin läsnä ollessa.

Kysteiini- ja asparagiinihappoproteaaseja voidaan identifioida Storeyn ja Wagnerin suositusten mukaan, Phytochemistry 25, nro 12 (1986) 2701 - 2709, joka identifioi proteaasien ominaisuuksia IUPAC-IUB-suositusten mukaan.

On edullista, että käytetään kysteiiniproteaasientsyymien inhibiittoria.

Mikä tahansa sopiva aktiivinen aineosa voidaan sisällyttää keksinnön mukaiseen säilörehun lisäaineeseen. Se voi olla kemiallinen aineosa kuten happo, esim. muurahais- tai rikkihappo tai niiden seoksia, tai bakteerialkuperää oleva aineosa. Hyvin sopivia bakteeriaineosia ovat maitohappoa tuottavat Lactobacillus, Streptococcus ja Pediococcus acidilactici ja Pediococcus pentosaceus -kannat, erityisesti Lactobacillus plantarum -kannat. Erityisen hyödyllinen kanta monien materiaalien säilörehuksi valmistamista varten on Lactobacillus plantarum -kanta MTD1,

jonka viljelmä on talletettu kokoelmaan the National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, UK ja sille on annettu talletusnumero NCIMB 40027. Talletus tapahtui 12. marraskuuta 1986, ja se hyväksyttiin talletukseksi patenttitarkoituksia varten 20. heinäkuuta 1988 ja Budapestin sopimuksen mukainen kansainvälinen muoto julkaistiin 25. heinäkuuta 1988. Muita sopivia kantoja ovat lajien Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus caseii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus brevis, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Streptococcus faecalis kannat ja erityisesti Lactobacillus amylophilus -kanta nro NCIMB 11546, Streptococcus lactis -kanta nro NCIMB 6681 ja Streptococcus thermophilus -kanta nro NCIMB 8510. Nämä kannat ovat yleisön saatavissa.

Edullisia kysteiiniproteaasien inhibiittoreita ovat kystatiinit, antipaiini ja erityisesti peptidiepoksidit kuten trans-epoksisukkinyyli-L-leusyyliamido-(4-guanidino)-butaani (E-64). Keksinnön edullisessa muodossa säilörehuksi valmistettavaa satoa käsitellään asparagiinihappoproteaasien inhibiittorilla kysteiiniproteaasien inhibiittorin lisäksi suuremman inhiboivan vaikutuksen aikaansaamiseksi. Eräs sopiva asparagiinihappoproteaasien inhibiittori on pepstatiini A.

E-64 voidaan valmistaa Hanadan et al. julkaisun mukaan, Agric. Biol. Chem. 42 (3) (1978) 529 - 536. Kystatiinin ovat kuvanneet Fossum et al., Arch. Biochem. Biophys. 125 (1968) 367. Sen ovat lisäksi puhdistaneet ja karakterisoineet Sen et al., Arch. Biochem. and Biophysics 158 (1973) 623. Antipaiini on kuvattu julkaisuissa Suda et al., J. Antibiotics. 25 (1972) 263 ja Umezawa et al., J. Antibiotics 25 (1972) 267. Pepstatiinin ovat kuvanneet Umezawa et al., J. Antibiotics 23 (1970) 259.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä kysteiiniproteaasien inhibiittori lisätään yleensä satoon säilörehun lisäaineen osana yhdessä aktiivisen aineosan sadon säilörehuksi valmistamista varten kanssa. Kuitenkin kysteiiniproteaasien inhibiittori voidaan myös lisätä erikseen, joko ennen aktiivista aineosaa tai sen jälkeen. Monissa tapauksissa on edullista lisätä kysteiiniproteaasien inhibiittori juuri leikattuun ruohoon ennen kuin siitä valmistetaan säilörehua. Kun käytetään sekä kysteiini- että asparagiinihappoproteaasien inhibiittoreita, on edullista, että ne lisätään samanaikaisesti.

Edullisesti kysteiiniproteaasien inhibiittoria lisätään säilörehuksi valmistettavaan satoon määränä, joka on väliltä 10 - 130 mikromoolia/kg satoa. Edullisesti inhibiittori lisätään pH-arvossa, joka on väliltä 3 - 7,5. Kun inhibiittori lisätään asparagiinihappoproteaasien inhibiittorin kanssa, kyseiset kaksi ainetta lisätään sopivimmin yhdessä, vaikka ne voidaan myös lisätä erikseen kummassa tahansa järjestyksessä. Edullisesti asparagiinihappoproteaasien inhibiittoria lisätään määränä, joka on väliltä 1 - 60 mg/kg satoa. Säilörehun valmistus suoritetaan sopivasti sellaisissa olosuhteissa, että mahdollinen hapen syöttö on rajoitettua tai happi on oleellisesti suljettu pois.

Keksinnön mukainen säilörehun lisäaine voidaan lisätä nesteenä tai hiukkasmaisena kiinteänä aineena. Kun se on määrä käyttää nesteenä, kantaja-aine sisältää vettä ja valinnaisesti esimerkiksi alempaa alkoholia, esimerkiksi propan-1-olia, kun taas sen kiinteänä aineena käytön tapauksessa kantaja-aine on kiinteä aine. Yleensä kiinteinä aineina käytettävät lisäaineet toimitetaan käyttäjille täydellisinä valmisteina, jotka sisältävät kantaja-aineet. Kuitenkin kun lisäaine on määrä lisätä nesteenä, käyttäjälle yleensä toimitetaan aktiivinen aineosa suspendoitavaksi sopivaan tilavuusmäärään vettä ennen käyttöä.

Kun keksinnön mukainen lisäaine on määrä lisätä kiinteänä aineena, mitä tahansa sopivaa ainetta voidaan käyttää kantaja-aineena keksinnön mukaisessa säilörehun lisäaineessa. Esimerkkejä sopivista kantaja-aineista ovat viljakasvit kuten jauhetut maissintähkät, jauhettu ohra ja vehnä ja muut aineet kuten kalkkikivi, savi, liitu, magnesiitti ja talkki.

Kantaja-aineiden, aktiivisten aineosien ja proteaasien inhibiittorien lisäksi säilörehun lisäaineet sisältävät yleensä muita aineita, joita on lisätty monista eri syistä. Mikä tahansa muu lisättävä aine voidaan sisällyttää vielä yhdeksi komponentiksi keksinnön mukaiseen aktiiviseen aineosaan. Muita aineita ovat ravinteet (jotka voivat olla sokereita kuten sakkaroosi, laktoosi jne.); kasvutekijät, jotka ovat tarpellisia joidenkin bakteerien kasvua varten (mukaan lukien hiivauute, maissinliotusliuos, vitamiineja ja aminohappoja); aineet, joita lisätään bakteerien elinkykyisyyden suojaamiseksi; antioksidantit; aineet hapen oton avustamiseksi ja öljyt ja muut aineet lisäaineiden pölyämistaipumusten vähentämiseksi tai satoon tarttumisen parantamiseksi.

Säilörehun lisäaineeseen sisällytettävän kantaja-aineen ja aktiivisen aineosan suhteelliset osuudet riippuvat lisäaineesta ja sen aktiivisuudesta.

Kun keksinnön mukainen lisäaine käytetään kiinteänä aineena, sitä lisätään sopivasti rehuun määränä, joka on väliltä 0,1 kg - 5 kg tonnia käsiteltävää rehua kohti, edullisesti väliltä 0,2 kg - 1 kg tonnia kohti. Kun lisäaine käytetään nesteenä, sitä lisätään sopivasti määränä, joka on väliltä 0,5 litraa - 5 litraa tonnia käsiteltävää rehua kohti, jolloin aktiivinen aineosa lisätään veteen määräksi, joka on väliltä 1 g - 100 g litraa kohti. Mitä tahansa sopivaa applikaattoria voidaan käyttää keksinnön mukaisen lisäaineen lisäämiseen joko kiinteänä aineena tai nesteenä.

Keksinnön mukaista säilörehun lisäainetta voidaan käyttää säilörehun valmistamiseen mistä tahansa sopivasta aineksesta mukaan lukien aikaisemmin tässä patenttijulkaisussa mainitut sadot. Se on kuitenkin erityisen hyödyllistä säilörehun valmistamista ruohokasveista varten.

Keksintöä valaistaan seuraavien esimerkkien avulla:

Esimerkki 1

(Diagnostinen)

Raiheinäuutteita puhdistettiin 60-kertaisesti ammoniumsulfaattisaostuksen, geelisuodatuksen ja ioninvaihtokromatografian avulla. Todettiin, että siten puhdistetut entsyymiaktiivisuudet olivat heterogeenisiä, mutta niille oli kuitenkin yhteistä samankaltainen inhiboituminen erilaisilla proteaasien inhibiittoreilla (taulukko 1). Oleellista inhibitiota todettiin ainoastaan p-kloorimerkuribentsoaatin vaikutuksesta, joka on kysteiiniproteaasien inhibiittori. Inhibitiota todettiin myös, mutta paljon vähäisemmässä määrin, pepstatiinilla, joka on asparagiinihappoproteaasien inhibiittori. Inhibitiota ei todettu fenyylimetyylisulfonyylifluoridin vaikutuksesta, joka on seriiniproteaasien inhibiittori. Näiden tulosten perusteella pääteltiin, että tärkein raiheinässä läsnä oleva proteaasien luokka ovat kysteiiniproteaasit.

Taulukko 1

Inhibiittori	**"Kohde"-entsyymi**	**Pitoisuus**	**Inhibitio (%)**
PCMB	kysteiini	1 mM	100
IODAA	kysteiini	1 mM	10
PMSF	seriini	1 mM	2
pepstatiini	asparagiinihappo	5 µg/ml	17

Taulukossa 1 olevat lyhennykset

PCMB: parakloorimerkuribentsoaatti

IODAA: jodietikkahappo

PMSF: fenyylimetyylisulfonyylifluoridi.

Esimerkki 2

Esimerkki 1 toistettiin käyttäen puskuroituja raiheinäuutteita. Uutteita inkuboitiin erilaisissa pH-arvoissa antibioottiyhdistelmän läsnä ollessa, joka sisällytettiin mukaan estämään fermentaatiota inkubaatioiden aikana. Käytetyt proteaasien inhibiittorit olivat spesifisiä erilaisille proteaasiluokille ja olivat pääasiallisesti peräisin mikrobeista. Tuloksista on yhteenveto taulukossa 2. Autolyysin inhibitio oli vähemmän selvää kuin se, joka havaittiin puolittainpuhdistetuilla valmisteilla esimerkissä 1. Kuitenkin inhibitiota todettiin jälleen vain käytettäessä E-64 (spesifinen kysteiiniproteaasien inhibiittori) ja pepstatiinia.

Taulukko 2

Inhibiittori	**"Kohde"-entsyymi**	**Pitoisuus**	**pH**	**Inhibitio (%)**
E-64	kysteiini	10 µM	4	13
pepstatiini	asparagiinihappo	5 µg/ml	5	47
aprotiniini	seriini	5,6 TIU	6	0
A-PMSF	seriini	130 µM	6	0

Taulukossa 2 olevat lyhennykset

E-64: trans-epoksisukkinyyli-L-leusyyliamido(4-guanidino)-butaani,

A-PMSF: (p-amidinofenyyli)metyylisulfonyylifluoridi,

TIU: trypsiinininhibiittoriyksikkö.

Esimerkki 3

Monivuotisesta raiheinästä (kuiva-ainetta (DM) 279 g/kg; veteen liukenevaa hiilihydraattia 113 g/g kuiva-ainetta; kokonais-N 26,5 g N/kg kuiva-ainetta; liukoista N 433 g/kg N) valmistettiin säilörehua. Ruohosta valmistettiin säilörehua käsitellen tai käsittelemättä muurahaishapolla (1,5 g/kg ruohoa) tarkoituksena valmistaa ruohosta säilörehua pH-arvossa 6,25 tai pH-arvossa 5. Ruoholle käytettiin kuutta käsittelyä (esitetty taulukossa 3) kummassakin pH-arvossa. Käytettiin neljää erilaista proteaasien inhibiittoria: E-64, kysteiiniproteaasien inhibiittori; pepstatiini, asparagiinihappoproteaasien inhibiittori; perunoiden vesiuute, joka sisälsi sekä seriini- että kysteiiniproteaasien inhibiittoreita; formaldehydi, joka vähentää proteolyysiä muodostamalla palautuvia ristisidoksia proteiinien välille. Kaikkiaan 36 siiloa täytettiin, jolloin oli kulloinkin kolme rinnakkaista siiloa käsittelyä kohti. Siilot käsittivät 100 ml:n suuruisia sylintereitä, jotka oli varustettu bunsenventtiileillä, ja 70 g ruohoa valmistettiin säilörehuksi kussakin siilossa. Siilot avattiin 82 päivän jälkeen. Kaikissa näytti säilörehun valmistuminen tapahtuneen hyvin ilman näkyvää pilaantumista. Säilörehun analyysit on annettu taulukoissa 4 ja 5.

Säilörehuksi valmistettavan ruohon pH-arvon alentamisella käyttäen muurahaishappoa oli vähän vaikutusta säilörehun koostumukseen. Vaikka muurahaishappokäsittelyllä oli merkittäviä vaikutuksia maito- ja etikkahapon ja etanolin pitoisuuksiin, nämä erot johtuivat sellaisen säilörehun heikosta fermentaatiolaadusta, josta valmistettiin säilörehua sekä muurahaishapolla että formaldehydillä käsittelemisen jälkeen. Tämän syyt eivät ole selviä.

Proteaasien inhibiittoreilla oli myös vähän vaikutusta säilörehun fermentaatioon. Verrattuna formaldehydillä käsittelemättömiin säilörehuihin perunauutteen li-

sääminen ei vaikuttanut proteiinien hajoittumiseen siilossa (taulukko 5). Ei myöskään pepstatiinin käyttö säilörehun valmistuksessa vaikuttanut säilörehun laatuun. Kuitenkin E-64, kysteiiniproteaasien inhibiittori, vähensi merkittävästi (P 0,001) säilörehun valmistuksen aikana tuotetun liukoisen N:n (0,80 kontrollin liukoisesta N:stä) ja ammoniakki-N:n (0,73 kontrollin ammoniakki-N:stä) määriä.

Näiden tutkimusten tulokset osoittavat, että kysteiiniproteaasit ovat tärkein proteaasityyppi, joka liittyy proteiinien hajoamiseen siilossa, ja että kysteiiniproteaasien spesifisten inhibiittorien, jotka ovat peräisin mikrobeista, lisääminen voi vähentää siilossa tapahtuvan proteolyysin määrää vaikuttamatta haitallisesti maitohapon tuotantoon siellä.

Taulukko 3

Käsittely	Pitoisuus
vesi	-
E-64	10 µM
pepstatiini	5 µg/ml
E-64 ja pepstatiini	kuten yllä
perunauute	laimentamaton uute
formaliini	3 g/kg ruohoa

Taulukko 4

Käsittely	DM	pH	WSC	Lac	Ac	Et
		(g/kg)			(g/kg DM)	
Säilörehun valmistus pH-arvossa 6,2						
Kontrolli	249	3,75	30,1	120	24,3	5,37
E-64	244	3,76	30,6	115	22,7	3,15
Pepstatiini	239	3,75	30,2	126	22,2	9,26
E-64 + pepstatiini	247	3,76	30,1	111	22,5	2,56
Peruna	244	3,72	30,0	124	23,1	7,22
Formaldehydi	254	3,76	29,6	115	20,8	2,67
Säilörehun valmistus pH-arvossa 5,0						
Kontrolli	250	3,69	30,2	124	22,1	0,5
E-64	249	3,72	30,2	115	19,6	0,92
Pepstatiini	251	3,72	29,9	115	21,0	0,5
E-64 + pepstatiini	244	3,80	30,9	102	17,5	2,25
Peruna	247	3,74	30,8	110	24,2	13,7
Formaldehydi	252	4,49	29,7	51	19,3	18,5
SE	0,5	0,086	0,60	7,0	1,16	1,06

Taulukossa 4 olevat lyhennykset

SE: keskiarvon keskivirhe 6 havaintoa varten,

Lac: laktaatti,

Ac: asetaatti,

Et: etanoli,

WSC: veteen liukeneva hiilihydraatti.

Taulukko 5

Käsittely	Kokonais-N (gN/kg DM)	Liukoinen-N (gN/kg N)	Ammoniakki-N (gN/kg) N
Säilörehun valmistus pH-arvossa 6,2			
Kontrolli	26,9	535	88,5
E-64	26,3	424	67,3
Pepstatiini	27,1	547	79,6
E-64 + pepstatiini	26,8	454	54,5
Peruna	26,2	524	86,9
Formaldehydi	24,4	528	85,6
Säilörehun valmistus pH-arvossa 5,0			
Kontrolli	22,1	520	85,3
E-64	27,4	357	58,1
Pepstatiini	25,3	597	75,8
E-64 + pepstatiini	26,5	414	49,6
Peruna	27,1	522	68,2
Formaldehydi	26,7	518	100,8
SE	0,49	2,4	0,48

Taulukossa 5 olevat lyhennykset

SE: keskiarvon keskivirhe 6 havaintoa varten.

Esimerkki 4

Monivuotista raiheinää pilkottiin noin 2 cm:n pituisiksi palasiksi ja 20 ml vettä tai alla kuvatun mukaista vesiliuosta lisättiin 70 g ruohoa kohti. Seos puristettiin kokoon ja pakattiin suljettuihin siiloihin, jotka

tiivistettiin ilman pääsyn estämiseksi ja pidettiin huoneenlämpötilassa kokeen keston ajan. Raiheinä sisälsi kuiva-ainetta 190 g/kg, veteen liukenevaa hiilihydraattia 241 g/kg kuiva-ainetta, kokonaistyppipitoisuuden 42,5 g/kg kuiva-ainetta ja liukoisen typen pitoisuuden 487 g/kg typpeä. Jäljellä oleva typpi oli läsnä oleellisesti proteiinina. 20 ml vettä tai liuosta sisälsi, milloin niin on ilmoitettu, riittävästi ilmoitettua entsyymin inhibiittoria ja/tai bakteerivalmistetta aikaansaamaan seuraavassa taulukossa esitetyt määrät mikrogrammoina grammaa tuoretta ruohoa kohti.

Taulukko 6

Käsittely	**Pitoisuus**			
	Tuoretta ruohoa µg/g		**Tuoretta ruohoa µm/g**	
Vesi (kontrolli)	-		-	
E-64	11,25		0,03	
	22,5		0,06	
	45,0		0,12	
Pepstatiini	30,0		0,04	
	(Pepstatiini)	(E-64)		
Pepstatiini & E-64	30,0	22,5	0,04	0,06
Antipaiini	32,0		0,04	
Kystatiini	1,2		0,9	
'ECOSYL'	3 l/t (2,85 g/l)			
'ECOSYL' & E-64	'ECOSYL' käytetty yllä olevana määränä E-64 käytetty määränä 22,5 µg/g ruohoa			

'ECOSYL' on kaupallisesti saatavana oleva säilörehun lisäaine vesisuspensiota varten, ja sitä valmistaa Imperial Chemical Industries PLC. 'ECOSYL' on toiminimen Imperial Chemical Industries PLC tavaramerkki. Tuote sisältää tärkeimpänä aktiivisena aineosanaan pakastekuivattua L. plantarum -kantaa NCIMB 48027 yhdessä ravintoaineiden kanssa. Kaikki käsittelyt suoritettiin kolmena rinnakkaisena. Siilot avattiin 50 päivän kuluttua ja kaikissa näytti säilörehun valmistuminen tapahtuneen hyvin ilman näkyvää pilaantumista. Pepstatiini on asparagiinihappoproteaasien inhibiittori. Antipaiini on kysteiini- ja seriiniproteaasien inhibiittori ja kystatiini on kysteiiniproteaasien inhibiittori. Niiden uskotaan sitoutuvan ekvimolaarisesti proteaasien kanssa. Seuraavissa taulukoissa ei-proteiinityppi (liukoinen typpi) ei käsitä ammoniakkia. SE tarkoittaa keskivirhettä, ja se on kussakin taulukossa kolmea havaintoa varten; La tarkoittaa laktaattia; Ac tarkoittaa asetaattia, ja Et tarkoittaa etanolia. Laktaatti ja asetaatti on ilmaistu vapaina happoina. Säilörehun valmistuksen tuotteiden tutkiminen osoitti, että proteaasien inhibiittoreilla oli vähän vaikutusta säilörehun fermentaatioon eivätkä ne vaikuttaneet maitohapon tuotantoon. Seuraavissa taulukoissa DM tarkoittaa kuiva-ainetta.

Taulukko 7

Suurenevien E-64-pitoisuuksien vaikutus säilörehun typpipitoisiin fraktioihin

E-64 pitoisuus µg/g ruohoa	**Kokonais-N gN/kg DM**	**Ei-proteiini-N gN/kgN**	**Ammoniakki-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
SE	0,89	2,22	0,71

SE, keskivirhe kolmea havaintoa varten
Ei-proteiinityppi ei käsitä ammoniakki-N.

Säilörehulla, jota oli käsitelty E-64:llä käyttäen määrää 11,25 µg/g ruohoa, liukoisen N:n (ei-proteiini-N) pitoisuus oli vähentynyt 87 %:ksi kontrollinäytteen N:n pitoisuudesta. Säilörehuilla, joita oli käsitelty E-64:llä käyttäen määrää 45,0 µg/g ruohoa, liukoinen pitoisuus oli vähentynyt 75 %:ksi kontrollinäytteen liukoisesta N:stä. Säilörehujen, joita oli käsitelty E-64:llä käyttäen määrää 45 µg/g ruohoa, ammoniakki-N-pitoisuus oli vähentynyt 70 %:ksi kontrollinäytteiden ammoniakki-N-pitoisuudesta.

Taulukko 8

Suurenevien E-64-pitoisuuksien vaikutukset säilörehujen koostumukseen

E-64:n käyttömäärä	**Säilörehun pH**	**DM**	**WSC**	**La**	**Ac**	**Eth**
0	3,48	156	20,6	184	22,5	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
SE	0,02	0,15	1,25	13,5	2,94	5,57

DM tarkoittaa kuiva-ainetta grammoina kilogrammaa kohti ja
WSC tarkoittaa veteen liukenevaa hiilihydraattia;
La tarkoittaa maitohappoa;
Ac tarkoittaa etikkahappoa;
Eth tarkoittaa etanolia;
kaikki ilmaistu grammoina kg:aa kuiva-ainetta kohti.

Kuiva-aineella tarkoitetaan jäännöstä tapauksesta riippuen ruohon tai säilörehun dehydraation jälkeen.

Taulukko 9

E-64:n ja pepstatiinin vaikutus säilörehun koostumukseen

Käsittely	Kokonais-N gN/kg DM	Ei-proteiini-N gN/kgN	Ammoniakki-N gN/kgN
Kontrolli	407	643	72,4
E-64 22,5 µg/g ruohoa	366	556	70,8
Pepstatiini 30 µg/g ruohoa	435	521	60,6
E-64 (30 µg/g ruohoa) ja pepstatiini (22,5 µg/g ruohoa)	428	438	62,9
SE	1,51	0,63	0,54

Pepstatiini vähensi liukoisen N:n määriä (81 % kontrollin N:stä). Liukoisen N:n määrän vähentyminen säilörehuissa oli suurempi käytettäessä pepstatiinia ja E-64 yhdessä verrattuna kunkin inhibiittorin käyttämiseen yksin. Säilörehuilla, joita käsiteltiin pepstatiinilla ja E-64:llä yhdessä, liukoisen N:n pitoisuus väheni 68 %:ksi kontrollin liukoisesta N:stä.

Taulukko 10

E-64:n ja pepstatiinin vaikutukset säilörehun koostumukseen

Käsittely	Säilörehun pH	DM	WSC	La	Ac	Eth
Kontrolli	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
E-64 22,5 µg/g ruohoa	3,48	163	24,2	188	22,2	33,3
Pepstatiini 30 µg/g ruohoa	3,61	164	17,5	168	16,1	36,0
E-64 30 µg/g ruohoa ja pepstatiini 22,5 µg/g ruohoa	3,56	163	11,1	171	23,9	38,9
SE	0,02	0,12	0,66	8,48	5,39	8,68

Taulukko 11

Kysteiiniproteaasien inhibiittorien vaikutukset säilörehun typpipitoisiin fraktioihin

Käsittely	Kokonais-N gN/kg DM	Ei-proteiini-N gN/kgN	Ammoniakki-N gN/kgN
Kontrolli	407	643	72,4
E-64 22,5 µg/g ruohoa	366	556	70,8
Kystatiini 1,2 µg/g ruohoa	406	571	75,7
Antipaiini	411	524	69,1
SE	1,02	2,40	0,76

Kystatiinilla käsiteltyjen säilörehujen liukoisen N:n pitoisuus oli vähentynyt 88 %:ksi kontrollin liukoisesta N:stä. Antipaiinilla käsitellyn säilörehun liukoisen N:n pitoisuus oli vähentynyt 81 %:ksi kontrollin liukoisesta N:stä.

Taulukko 12

Kysteiiniproteaasien inhibiittorien vaikutukset säilörehun koostumukseen

Käsittely	**Säilörehun pH**	**DM**	**WSC**	**La**	**Ac**	**Eth**
Kontrolli	3,48	156	20,5	184	22,5	10,0
E-64 22,5 µg/g ruohoa	3,48	163	24,2	190	22,2	33,3
Antipaiini 32 µg/g ruohoa	3,55	161	24,1	163	28,8	4,31
Kystatiini 1,2 µg/g ruohoa	3,65	160	17,2	183	29,4	4,55
SE	0,03	3,09	0,93	19,2	8,57	5,07

Taulukko 13

E-64:n ja ECOSYLin vaikutukset säilörehun typpipitoisiin fraktioihin

Käsittely	Kokonais-N gN/kg DM	Ei-proteiini-N gN/kgN	Ammoniakki-N gN/kgN
Kontrolli	407	643	72,4
E-64 22,5 µg/g ruohoa	366	586	70,8
'ECOSYL' 8,55 µg/g ruohoa	378	533	63,2
E-64 22,5 µg/g ruohoa ja 'ECOSYL' 8,55 g/l	355	421	53,3
SE	0,79	1,51	0,79

ECOSYLillä käsitellyllä säilörehulla liukoisen N:n määrä oli vähentynyt 82 %:ksi kontrollin liukoisesta N:stä. E-64:llä ja ECOSYLillä käsitellyn säilörehun tapauksessa määritettiin suurempi liukoisen N:n pitoisuuden pieneneminen verrattuna tulokseen, joka saatiin käytettäessä kutakin käsittelyä erikseen. Kun ECOSYL ja E-64 oli lisätty yhdessä, säilörehun liukoisen N:n pitoisuus oli vähentynyt 65 %:ksi kontrollin liukoisesta N:stä.

Taulukko 14

E-64:n ja ECOSYLin vaikutukset säilörehun koostumukseen

Käsittely	Säilörehun pH	DM	WSC	La	Ac	Eth
Kontrolli	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
E-64 22,5 µg/g ruohoa	3,48	163	24,1	188	22,2	33,3
'ECOSYL' 8,55 µg/g ruohoa	3,63	154	16,0	149	42,6	11,2
'ECOSYL' 8,55 µg/g ruohoa ja E-64 (22,5 µg/g ruohoa)	3,45	164	28,9	132	42,0	30,2
SE	0,03	0,11	0,92	13,9	8,53	5,45

Johtopäätökset

Tulokset osoittavat, että kysteiini- ja asparagiinihappoproteaasit ovat aktiivisia säilörehun valmistuksen aikana. Kysteiini- ja asparagiinihappoproteaasien biologista alkuperää olevien spesifisten inhibiittorien lisääminen vähensi proteolyysin määrää siilossa vaikuttamatta haitallisesti maitohapon tuotantoon siilossa.

ECOSYLillä käsitellyn säilörehun liukoisen N:n pitoisuuden vähentymisen verrattuna kontrollisäilörehyjen pitoisuuteen voitiin katsoa johtuvan pH-arvon vaikutuksesta raiheinän proteolyyttisiin entsyymeihin (joiden on osoitettu olevan optimaalisen aktiivisia pH-arvossa 5 - 7 ; ECOSYLillä käsitellyllä säilörehulla olisi odotet-

tu nopeampaa pH-arvon alenemista säilörehun valmistuksen alkuvaiheiden aikana verrattuna kontrollisäilörehuihin.

Yhdistelmä, jossa oli kysteiini- ja asparagiinihappoproteaasien inhibiittoreita tai kysteiiniproteaasien inhibiittori ja ECOSYL, näytti vähentävän proteolyysiä siilossa suuremmassa määrin kuin käsittelyt yhdellä ainoalla vaikuttaja-aineella.

Patenttivaatimukset:

1. Säilörehun lisäaine, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aktiivisen aineosan säilörehun valmistamiseksi sadosta ja vähintään yhden proteaasietsyymien inhibiittorin, joka on valittu kysteiiniproteaasien inhibiittoreista ja asparagiinihappoproteaasien inhibiittoreista ja jo(t)ka inhibiittori(t) on (ovat) biologista alkuperää.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aineosa on happo tai bakteerialkuperää oleva aineosa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että bakteeriaineosa on maitohappoa tuottava maitohappobakteeri- ja/tai streptokokki- ja/tai Pediococcus-kanta.

4. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että kysteiiniproteaasien inhibiittori on kystatiini tai antipaiini tai trans-epoksisukkinyyli-L-leusyyliamido(4-guanidino)butaani.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että siinä trans-epoksisukkinyyli-L-leusyyliamido(4-guanidino)butaani on valmistettu julkaisun Hanada et al., Agric. Biol. Chem. 42 (3) (1978) 529 - 536 mukaan.

6. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että asparagiinihappoproteaasien inhibiittori on pepstatiini.

7. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että sekä kysteiini- että asparagiinihappoproteaasientsyymien inhibiittori on läsnä.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että se on nestemäisessä kantaja-aineessa, joka sisältää vettä.

9. Menetelmä säilörehun tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan sadosta säilörehua vähintään yhden sellaisen proteaasientsyymien inhibiittorin läsnä ollessa, joka on valittu kysteiiniproteaasien inhibiittorin ja asparagiinihappoproteaasien inhibiittori(e)n joukosta ja jo(t)ka inhibiittori(t) on (ovat) biologista alkuperää.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kysteiiniproteaasien inhibiittori lisätään juuri leikattuun ruohoon ennen kuin siitä valmistetaan säilörehua.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kysteiiniproteaasien inhibiittoria lisätään määrä, joka on väliltä 10 - 130 mikromoolia/kg satoa.

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 9 - 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että asparagiinihappoproteaasien inhibiittoria lisätään määrä, joka on väliltä 1 - 60 mg/kg satoa.

13. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 9 - 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH on väliltä 3 - 7,5, kun inhibiittori lisätään satoon.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 9 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nestemäistä lisäainetta, joka sisältää proteaasien inhibiittoria määränä 1 - 100 grammaa litraa kohti vettä sisältävässä kantaja-aineessa, lisätään käsiteltävään rehuun määränä, joka on väliltä 0,5 - 5 litraa tonnia kohtia.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 9 - 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että säilörehu valmistetaan ruohon, viljanjyvien, palkokasvin tai riisin fermentoinnin avulla.

16. Säilörehu, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksen 9 - 15 mukaisella menetelmällä tai käyttämällä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaista lisäainetta.

Patentkrav:

1. Ensilagetillsats, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en aktiv ingrediens förensilaget från en skörd och åtminstone en proteasenzyminhibitor, vilken valts bland cysteinproteasinhibitorer och asparaginsyraproteasinhibitorer, varvid inhibitorn (inhibitorerna) är av biologiskt ursprung.

2. Tillsats enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den aktiva ingrediensen är en syra eller en ingrediens av bakteriellt ursprung.

3. Tillsats enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att den bakteriella ingrediensen är en mjölksyraproducerande stam av Lactobacillus och/eller Streptococcus och/eller Pediococcus.

4. Tillsats enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d därav, att cysteinproteasinhibitorn är cystatin eller ett antismärtmedel eller trans-epoxi-succinyl-L-leucyl-amido-(4-guanidino)butan.

5. Tillsats enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att trars-epoxi-succinyl-L-leucyl-amido-(4-guanidino)butanet framställts i enlighet med Hanada et al:s förfarande i publikationen Agric.Biol. Chem. 42 (3) 529 till 536 (1978).

6. Tillsats enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d därav, att asparaginproteasinhibitorn är pepstatin.

7. Tillsats enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d därav, att både en cystein- och en asparaginsyraproteasenzyminhibitor är närvarande.

8. Tillsats enligt något av patentkraven 1 - 7 i en flytande bärare som omfattar vatten.

9. Förfarande för framställning av ensilage, k ä n n e t e c k n a t därav, att en skörd ensilagebe-

handlas i närvaro av åtminstone en proteasenzyminhibitor, vilken valts bland en cysteinproteasinhibitor och en eller flera asparaginsyraproteasinhibitorer, varvid nämnda inhibitor(-er) är av biologiskt ursprung.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att en cysteinproteasinhibitor anbringas på nybärgat gräs innan det ensilagebehandlas.

11. Förfarande enligt patentkravet 9 eller 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att cysteinproteasinhibitorn anbringas i en mängd av 10 - 130 µmol/kg skörd.

12. Förfarande enligt något av patentkraven 9 - 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att asparaginsyraproteasinhibitorn anbringas i en mängd av 1 - 60 mg/kg skörd.

13. Förfarande enligt något av patentkraven 9 - 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att pH-värdet ligger i området 3 - 75 då inhibitorn anbringas på skörden.

14. Förfarande enligt något av patentkraven 9 - 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att en flytande tillsats, vilken omfattar proteasinhibitorn i en mängd av 1 - 100 gram per liter i en bärare, som omfattar vatten, anbringas i en grad av 0,5 - 5 liter per ton foder som skall behandlas.

15. Förfarande enligt nagot av patentkraven 9 - 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att ensilaget framställs genom fermentering av gräs, säd, någon legym eller ris.

16. Ensilage som framställts genom ett förfarande enligt något av patentkraven 9 - 15 eller genom användning av en tillsats enligt något av patentkraven 1 - 8.