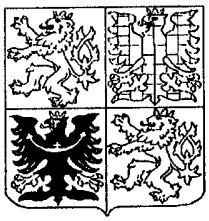
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 277-93

(13) A3

5(51) A 23 K 3/00

(22) 25. 02. 93

(32) 31. 08. 90, 27. 08. 91

(31) 90/19024, 91GB/9101438

(33) GB, WO

(40) 13. 10. 93

(71) IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, London, GB;

(72) Wetherall Jane Ann, Tyne and Wear, GB;
Rooke John Andrew, Aberdeen, GB;

(54) Silážní přísada

(57) Výroba siláže se provádí v přítomnosti inhibitorů cysteinové a/nebo asparagové proteasy.

171094/JT

277-93 ~~274-93~~

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO
25. II. 93
č.j.
0 0 8 [illegible] 4 6

Silážní přísada

Oblast techniky

Vynález se týká silážní přísady a způsobu produkce siláže.

Dosavadní stav techniky

Siláž se vyrábí fermentací plodin jako jsou trávy; obiloviny, například kukuřice, pšenice, ječmen a čirok; leguminosy, například jetele, hrachy a vojtěška; a rýže. Fermentace je ve své nejjednodušší podobě přírodní fermentací, kterou způsobují přírozené mléčnou kyselinu-produkující bakterie přítomné v plodině v době její sklizně. Fermentace však může být zlepšena přidáním silážních přísad k plodině, přičemž tyto silážní přísady mohou být chemické nebo bakteriální, to jest obsahující vybrané mléčnou kyselinu produkující bakterie. Použití těchto silážních přísad způsobuje lepší konzervaci a zvýšenou stabilitu silážního produktu, se sníženými ztrátami v sile a zlepšenou užitkovostí zvířat krmených tímto produktem. Silážní přísady mohou být ke sklizené plodině přidány buď ve formě tekutých suspenzí aplikovaných za použití vhodného aplikátoru, nebo ve formě pevných prostředků obsahujících účinnou složku smíchanou s nosiči.

Během silážování jsou rostlinné bílkoviny ve velkém rozsahu hydrolýzovány na peptidy a aminokyseliny působením rostlinných proteas a následně deaminovány mikrobiální činností. Dusíkaté složky siláže tedy sestávají převážně z aminokyselin, krátkých peptidů a amoniaku, v protikladu k zelené hmotě, která obsahuje průměrně 750 - 850 g pravého bílkovinného dusíku na kg celkového dusíku.

Dusík siláže je špatně využíván jako substrát pro syntézu bílkovin mikroby v bachoru, a proto je nutné doplňovat výživu silážní drahými krmivy bohatými na bílkoviny, jako jsou

sojová moučka a rybí moučka.

V současnosti je málo známo o mechanismu, kterým jsou během silážování trav hydrolýzovány rostlinné bílkoviny. Je však žádoucí zlepšovat nutriční hodnotu siláže omezením nebo odstraněním proteolýzy, která probíhá během silážování.

Podstata vynálezu

Podle vynálezu se silážní přísada vyznačuje tím, že obsahuje účinnou složku pro silážování plodiny a alespoň jeden inhibitor enzymu proteasy, vybraný ze skupiny zahrnující inhibitory cysteinové proteasy a inhibitory asparagové proteasy, přičemž tento inhibitor nebo inhibitory jsou biologického původu.

Dále se podle vynálezu způsob výroby siláže vyznačuje tím, že se plodina silážuje v přítomnosti alespoň jednoho uvedeného inhibitoru.

Cysteinové a asparagové proteasy mohou být identifikovány jak to doporučili Storey a Wagner, Phytochemistry, 25, č. 12, 2701 až 2709 (1986), čímž se identifikují vlastnosti proteas v souladu s doporučeními IUPAC - IUB.

Výhodné je použití inhibitoru enzymů cysteinových proteas.

Silážní přísada podle vynálezu může obsahovat libovolnou vhodnou účinnou složku. Může jít o chemickou složku, jako je kyselina, například kyselina mravenčí nebo sírová či jejich směsi, nebo o složku bakteriálního původu. Velmi vhodnými bakteriálními složkami jsou mléčnou kyselinu produkující kmeny Lactobacillus, Streptococcus, dále Pediococcus acidilactici a Pediococcus pentosaceus, a zejména kmeny Lactobacillus plantarum. Zvláště užitečný pro silážování mnoha materiálů je kmen Lactobacillus plantarum MTD1, jehož kultura byla uložena v Národních sbírkách průmyslových a mořských bakterií (NCIMB = National Collections of Industrial and Marine

Bacteria), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, UK, a bylo jí přiděleno číslo NCIMB 40027. Uložení bylo provedeno 12. listopadu 1986 a bylo uznáno jako uložení pro patentové účely 20. července 1988; mezinárodní dokument podle Budapešťské dohody byl vydán 25. července 1988. Dalšími vhodnými kmeny jsou kmeny druhů Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus caseii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus brevis, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Streptococcus faecalis, Lactobacillus amylophilus, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, a zejména kmen Lactobacillus amylophilus č. NCIMB 11546, kmen Streptococcus lactis č. NCIMB 6681 a kmen Streptococcus thermophilus č. NCIMB 8510. Tyto kmeny jsou veřejně dostupné.

Výhodnými inhibitory cysteinové proteasy jsou cystatiny, antipain a zejména peptidové epoxidy jako je trans-epoxy-sukcinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butan (E-64). Podle výhodného provedení vynálezu se silážovaná plodina ošetří kromě inhibitoru cysteinové proteasy inhibitorem asparagové proteasy, s cílem dosažení rozšířeného inhibičního účinku. Mezi vhodné inhibitory asparagové proteasy patří pepstatin A.

E-64 lze připravit podle článku, který uveřejnili Hanada a kol., Agric. Biol. Chem., 42 (3), 529 až 536 (1978). Cystatin popsali Fossum a kol., Arch. Biochem. Biophys. 125, 367, 1968. Dále ho čistili a charakterizovali Sen a kol., Arch. Biochem. a Biophysics 158, 623, (1973). Antipain popsali Suda a kol., J. Antibiotics. 25 263 (1972) a Umezawa a kol., J. Antibiotics 25 267 (1972). Pepstatin popsali Umezawa a kol., J. Antibiotics 23 259 (1970).

Ve způsobu podle vynálezu se inhibitor cysteinové proteasy k plodině obecně aplikuje jako součást silážní přísady společně s účinnou složkou pro silážování této plodiny, ačkoli může být inhibitor cysteinové proteasy aplikován též odděleně, a to buď před nebo po účinné složce. V mnoha případech je výhodné aplikovat inhibitor cysteinové proteasy

na čerstvě posečenou trávu předtím, než je silážována. Pokud jsou používány inhibitory jak cysteinové tak asparagové proteasy, je výhodné je aplikovat ve stejnou dobu.

Inhibitor cysteinové proteasy je výhodné aplikovat k plodině, která má být silážována, v množství v rozmezí 10 až 130 μmol / kg plodiny. Výhodné je inhibitor aplikovat při pH v rozmezí 3 až 7,5. Pokud je společně s tímto inhibitorem aplikován inhibitor asparagové proteasy, je nejvhodnější aplikovat tyto dvě látky společně, ačkoli mohou být aplikovány též odděleně v libovolném pořadí. Inhibitor asparagové proteasy je výhodné aplikovat v množství v rozmezí 1 až 60 mg / kg plodiny. Silážování je vhodné provádět za podmínek, kdy je omezen přívod kyslíku, nebo je kyslík v podstatě vyloučen.

Silážní přísada podle vynálezu může být aplikována jako kapalina nebo jako pevná látka ve formě částic. Pokud má být aplikována jako kapalina, obsahuje nosič vodu, a popřípadě například nižší alkohol, například propan-1-ol, zatímco má-li být aplikována jako pevná látka, je nosičem pevný materiál. Obecně se přísady, které mají být aplikovány jako pevné látky, dodávají uživateli jako kompletní směs včetně nosičů, kdežto v případě, že má být přísada aplikována jako kapalina, dodává se uživateli obecně účinná složka, která se před použitím suspenduje v odpovídajícím objemu vody.

Pokud má být přísada podle vynálezu aplikována jako pevná látka, může být jako nosič silážní přísady podle vynálezu použit libovolný vhodný materiál. Příklady vhodných nosičů jsou obiloviny jako drcené kukuřičné palice, ječný a pšeničný šrot a další materiály jako vápenec, jíl, křída, magnezit a mastek.

Silážní přísady obecně obsahují kromě nosičů, účinných látek a inhibitorů proteasy ještě další látky, přidávané z různých důvodů. Libovolná další přidaná látka může být zahrnuta jako další komponenta v účinné složce podle vynálezu. Mezi další látky patří živiny (kterými mohou být cukry jako

je sacharosa, laktosa atd.); růstové faktory, které jsou nezbytné pro růst některých bakterií (včetně kvasničného extraktu, kukuřičného výluhu, vitaminů a aminokyselin); látky přidávané z důvodů ochrany životaschopnosti bakterií; antioxidační látky; látky napomáhající příjmu kyslíku a oleje a další látky snižující sklony přísad k prašnosti nebo zlepšující přilnavost k plodinám.

Relativní poměry nosiče a účinné složky přítomných v silážní přísadě závisí na přísadě a jejím působení.

Pokud je přísada podle vynálezu aplikována ve formě pevné látky, je vhodné ji dodávat do píce v množství v rozmezí 0,1 až 5 kg na tunu ošetřované píce, s výhodou v rozmezí 0,2 kg až 1 kg na tunu. Pokud je přísada aplikována jako kapalina, je vhodné ji dodávat v množství v rozmezí 0,5 litru až 5 litrů na tunu ošetřované píce, přičemž účinná složka se přidává do vody v množství v rozmezí 1 g až 100 g na litr. K aplikaci přísady podle vynálezu ať už jako pevné látky nebo v kapalině, může být použit libovolný vhodný aplikátor.

Silážní přísada podle vynálezu může být použita k výrobě siláže z libovolného vhodného materiálu včetně plodin uvedených dříve v tomto popisu, je však zejména vhodná pro silážování trav.

Vynález ilustrují následující příklady provedení vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 (diagnostický)

Extrakty jílku vytrvalého se šedesátinásobně čistí srážením síranem amonným, gelovou filtrací a chromatografií na iontoměničích. Zjistí se, že aktivity takto vyčištěných enzymů jsou nestejnorodé, ale přesto sdílejí stejný model inhibice různými inhibitory proteas (Tabulka 1). Podstatná

inhibice byla zjištěna pouze s p-chlormerkuribenzoátem, který je inhibitorem cysteinové proteasy. Inhibice byla též zjištěna s pepstatinem, který je inhibitorem asparagových proteas, ale v mnohem menším rozsahu. Nebyla zjištěna inhibice s fenylmethylsulfonyl-fluoridem, který je inhibitorem serinové proteasy. Z těchto údajů byl vyvozen závěr, že hlavní skupinou proteas přítomných v jílku vytrvalém jsou cysteinové proteasy.

Tabulka 1

Inhibitor	"Cílový" enzym	Koncentrace	Inhibice %
PCMB	cysteinový	1 mM	100
IODAA	cysteinový	1 mM	10
PMSF	serinový	1 mM	2
Pepstatin	asparagový	5 ug/ml	17

Legenda k tabulce 1:

PCMB : parachlormerkuribenzoát,
IODAA : jodoctová kyselina,
PMSF : fenylmethylsulfonyl-fluorid.

Příklad 2

Příklad 1 se opakuje za použití pufrovaných extraktů jílku vytrvalého. Extrakty se inkubují při rozdílných hodnotách pH v přítomnosti kombinace antibiotik, která se používají, aby zabránila fermentaci během inkubací. Použité inhibitory proteas byly specifické pro různé skupiny proteas a byly převážně mikrobiálního původu. Výsledky jsou shrnuty

v Tabulce 2. Inhibice autolýzy byla méně patrná než inhibice pozorovaná u částečně vyčištěných preparátů v Příkladu 1. Inhibice však byla opět pozorována pouze za použití E-64 (specifického inhibitoru cysteinové proteasy) a pepstatinu.

Tabulka 2

Inhibitor	"Cílový" enzym	Koncentrace	pH	Inhibice %
E-64	cysteinový	10 uM	4	13
Pepstatin	asparagový	5 ug / ml	5	47
Aprotinin	serinový	5,6 TIU	6	0
A-PMSF	serinový	130 uM	6	0

Legenda k tabulce 2:

E-64 : trans-epoxy-sukcinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)-butan,
A-PMSF : (p-amidinofenyl)methylsulfonyl-fluorid,
TIU : trypsinová inhibiční jednotka.

Příklad 3

Silážuje se víceletý jílek vytrvalý (sušina (DM = dry matter) 279 g / kg, vodou rozpustné uhlohydráty 113 g / kg sušiny, celkový dusík 26,5 g N / kg sušiny, rozpustný dusík 433 g / kg N). Tráva se silážuje buď ošetřená nebo neošetřená kyselinou mravenčí (1,6 g /kg zelené hmoty), což má za cíl silážovat trávu při pH 6,25 nebo pH 5. Provede se 6 ošetření trávy (uvedených v Tabulce 3) při každém pH. Použijí se čtyři různé inhibitory proteas: E-64 (inhibitor cysteinové proteasy), pepstatin (inhibitor asparagové proteasy), vodný ex-

trakt z brambor, který obsahuje inhibitory jak serinové tak cysteinové proteasy, a formaldehyd, který snižuje proteolýzu vytvářením reverzibilních zesítěných vazeb mezi bílkovinami. Celkově se naplní 36 sil, protože každé ošetření se opakuje ve třech silech. Sila tvoří 100 ml odměrné válce vybavené Bunsenovými ventily, a v každém sile se silážuje 70 g trávy.

Sila se otevřou po 82 dnech. Ve všech siláž vypadá dobře konzervovaná bez viditelného kažení. Výsledky analýz siláží jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5.

Snížení pH silážované trávy pomocí kyseliny mravenčí mělo malý vliv na složení siláže. Ošetření kyselinou mravenčí však mělo podstatný vliv na koncentraci kyseliny mléčné, kyseliny octové a ethanolu; tyto rozdíly vznikaly vlivem špatné kvality fermentace siláže konzervované po ošetření jak kyselinou mravenčí tak formaldehydem. Důvody tohoto jevu nejsou jasné.

Inhibitory proteas měly též malý vliv na fermentaci siláže. Ve srovnání s formaldehydem neošetřenými silážemi neovlivnilo přidání extraktu z brambor rozklad bílkovin v sile (Tabulka 5). Ani použití pepstatinu neovlivnilo kvalitu siláže. Avšak E-64, který je inhibitorem cysteinové proteasy, významně ($P < 0,001$) snižoval množství rozpustného dusíku (0,80 rozpustného dusíku kontroly) a amoniakálního dusíku (0,73 amoniakálního dusíku kontroly), produkovaných během silážování.

Výsledky těchto studií ukazují, že cysteinové proteasy jsou hlavním typem proteas účastnících se rozkladu bílkovin v sile, a že přidání specifických inhibitorů cysteinových proteas, mikrobiálního původu, může snižovat rozsah proteolýzy probíhající v sile, aniž by v něm nepříznivě ovlivňovalo tvorbu mléčné kyseliny.

Tabulka 3

Ošetření	Koncentrace
Voda	-
E-64	10 /uM
Pepstatin	5 /ug / ml
E-64 a Pepstatin	jako výše
Extrakt z brambor	neředěný extrakt
Formalín	3 g / kg trávy

Tabulka 4

Ošetření	Sušina	pH	WSC (g/kg)	Lac	Ac (g/kg sušiny)	Et
Silážováno při pH 6,2						
Kontrola	249	3,75	30,1	120	24,3	5,37
E-64	244	3,76	30,6	115	22,7	3,15
Pepstatin	239	3,75	30,2	126	22,2	9,26
E-64 + Pepstatin	247	3,76	30,1	111	22,5	2,56
Extrakt z brambor	244	3,72	30,0	124	23,1	7,22
Formaldehyd	254	3,76	29,6	115	20,8	2,67
Silážováno při pH 5,0						
Kontrola	250	3,69	30,2	124	22,1	0,5
E-64	249	3,72	30,2	115	19,6	0,92

Pokračování Tabulky 4:

Ošetření	Sušina	pH	WSC	Lac	Ac (g/kg sušiny)	Et
		(g/kg)				
Pepstatin	251	3,72	29,9	115	21,0	0,5
E-64 + Pepstatin	244	3,80	30,9	102	17,5	2,25
Extrakt z brambor	247	3,74	30,8	110	24,2	13,7
Formaldehyd	252	4,49	29,7	51	19,3	18,5
SE	0,5	0,086	0,60	7,0	1,16	1,06

Legenda k tabulce 4:

SE : standardní odchylka průměru ze 6 pozorování,
Lac : kyselina mléčná,
Ac : kyselina octová,
Et : ethanol,
WSC : vodou rozpustné uhlohydráty.

Tabulka 5

Ošetření	Celkový N (gN/kg sušiny)	Rozpustný N (gN/kg N)	Amoniakální N (gN/kg N)
<u>Silážováno při pH 6,2</u>			
Kontrola	26,9	535	88,5
E-64	26,3	424	68,3
Pepstatin	27,1	547	79,6

Pokračování Tabulky 5:

Ošetření	Celkový N (gN/kg sušiny)	Rozpustný N (gN/kg N)	Amoniakální N (gN/kg N)
E-64 + Pepstatin	26,8	454	54,5
Extrakt z brambor	26,2	524	86,9
Formaldehyd	24,4	528	85,6
Silážováno při pH 5,0			
Kontrola	22,1	520	85,3
E-64	27,4	357	58,1
Pepstatin	25,3	597	75,8
E-64 + Pepstatin	26,5	414	49,6
Extrakt z brambor	27,1	522	68,2
Formaldehyd	26,7	518	100,8
SE	0,49	2,4	0,48

Legenda k tabulce 5:

SE : Standardní odchylka průměru ze 6 pozorování

Příklad 4

Víceletý jílek vytrvalý se naseká na délku přibližně 2 cm a přidá se 20 ml vody nebo níže popsaného vodného roztoku na 70 gramů trávy. Směs se stlačí a uloží do uzavřených sil neumožňujících přístup vzduchu a uchovávaných při teplotě místnosti po dobu trvání experimentu. Jílek vytrvalý obsahoval sušinu 190 g /kg, vodou rozpustné uhlohydráty v

množství 241 g / kg sušiny, celkový dusík v množství 42,5 g / kg sušiny a rozpustný dusík v množství 487 g / kg dusíku. Zbylý dusík byl přítomen v podstatě jako bílkovina. 20 ml vody nebo roztoku obsahovalo tam, kde je to uvedeno, dostatečné množství inhibitoru enzymu nebo/a uvedeného bakteriálního preparátu, aby se získala množství v mikrogramech na gram čerstvé trávy uvedená v následující tabulce.

Tabulka 6

Ošetření	Koncentrace			
	/ug/g čerstvé trávy		/um/g čerstvé trávy	
Voda (kontrola)	-		-	
E-64	11,25		0,03	
	22,5		0,06	
	45,0		0,12	
Pepstatin	30,0		0,04	
	(Pepstatin)	(E-64)		
Pepstatin a E-64	30,0	22,5	0,04	0,06
Antipain	32,0		0,04	
Cystatin	1,2		0,9	
´ECOSYL´	3 l/t (2,85 g/l)			
´ECOSYL´	´ECOSYL´ aplikován ve výše uvedené dávce, E-64 aplikováno 22,5 /ug/g trávy			

´ECOSYL´ je komerčně dostupná silážní přísada pro vodné suspenze vyráběná Imperial Chemical Industries PLC. ´ECOSYL´ je ochranná známka Imperial Chemical Industries PLC. Tento produkt obsahuje jako svou hlavní účinnou složku kmen L. plantarum NCIMB 48027 sušený vymražením, společně s živinami. Všechna ošetření byla provedena ve třech opakováních. Sila byla otevřena po 50 dnech a siláž ve všech silech vypadala dobře konzervovaná bez viditelného kažení. Pepstatin je inhibitorem asparagové proteasy. Antipain je inhibitorem cysteinových a serinových proteas a Cystatin je inhibitorem cysteinových proteas. Předpokládá se u nich, že se ekvimolekulárně vážou s proteasami. V následujících tabulkách nebílkovinný dusík (rozpustný dusík) nezahrnuje amoniak. SE znamená standardní odchylku, která je ve všech tabulkách pro tři pozorování; symbol La znamená laktát; symbol Ac představuje acetát a Et znamená ethanol. Laktát a acetát jsou vyjádřeny jako volné kyseliny. Zkoumání produktů silážování ukázalo, že inhibitory proteas mají malý vliv na fermentaci siláže,a že produkce kyseliny mléčné nebyla ovlivněna. V následujících tabulkách DM znamená sušinu.

Tabulka 7

Vliv zvyšování koncentrací E-64 na dusíkaté frakce siláže

Koncentrace E-64 ug/g trávy	Celkový N gN/kg DM	Nebílkovinný N gN/kgN	Amoniakální N gN/kgN
0	407	643	72,4
11,25	360	558	61,1
22,5	366	586	70,8

Pokračování Tabulky 7:

Koncentrace E-64 /ug/g trávy	Celkový N gN/kg DM	Nebílkovinný N gN/kgN	Amoniakální N gN/kgN
45,0	359	481	51,0
SE	0,89	2,22	0,71

SE : standardní odchylka pro tři pozorování,

Nebílkovinný N nezahrnuje amoniak.

U siláží ošetřených E-64 v dávce 11,25 /ug / g trávy se snížil obsah rozpustného dusíku (nebílkovinného dusíku) na 87 % ve srovnání s obsahem dusíku v kontrolním vzorku. U siláží ošetřených E-64 v dávce 45,0 /ug / g trávy se snížil obsah rozpustného dusíku na 75 % ve srovnání s obsahem rozpustného dusíku v kontrolním vzorku. Obsah amoniakálního dusíku se u siláží ošetřených E-64 v dávce 45 /ug / g trávy snížil na 70 % ve srovnání s obsahem amoniakálního dusíku v kontrolním vzorku.

Tabulka 8

Vlivy zvyšování koncentrací E-64 na složení siláže

Aplikační dávka E-64	pH siláže	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

Legenda k Tabulce 8:

DM znamená sušinu v gramech na kilogram a
WSC znamená vodou rozpustné uhlohydráty,
La znamená kyselinu mléčnou,
Ac znamená kyselinu octovou,
Eth znamená ethanol,
vše vyjádřeno v gramech na kilogram sušiny.

Pojmem sušina je míněn zbytek po dehydrataci trávy nebo siláže.

Tabulka 9

Vliv E-64 a pepstatinu na složení siláže

Ošetření	Celkový N gN/kg sušiny	Nebílkovinný N gN/kgN	Amoniakální N gN/kgN
Kontrola	407	643	72,4
E-64 22,5 /ug/g trávy	366	556	70,8
Pepstatin 30 /ug/g trávy	435	521	60,6
E-64 (30 /ug/g trávy) a Pepstatin (22,5 /ug/g trávy)	428	438	62,9
SE	1,51	0,63	0,54

Pepstatin snižoval množství rozpustného dusíku (81 % dusíku kontroly). Snížení množství rozpustného dusíku v silážích bylo vyšší při společné aplikaci pepstatinu a E-64 ve srovnání se samostatnou aplikací každého inhibitoru. U siláží ošetřených společně pepstatinem a E-64 se snížil obsah rozpustného dusíku na 68 % rozpustného dusíku v kontrole.

Tabulka 10

Vliv E-64 a pepstatinu na složení siláže

Ošetření	pH siláže	DM	WSC	La	Ac	Eth
Kontrola	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
E-64 (22,5 /ug/g trávy)	3,48	163	24,2	188	22,2	33,3
Pepstatin (30 /ug/g trávy)	3,61	164	17,5	168	16,1	36,0
E-64 (30 /ug/g trávy) a Pepstatin (22,5 /ug/g trávy)	3,56	163	11,1	171	23,9	38,9
SE	0,02	0,12	0,66	8,48	5,39	8,68

Legenda k Tabulce 10:

DM znamená sušinu v gramech na kilogram a
WSC znamená vodou rozpustné uhlohydráty,
La znamená kyselinu mléčnou,
Ac znamená kyselinu octovou,
Eth znamená ethanol,
vše vyjádřeno v gramech na kilogram sušiny, a
SE znamená standardní odchylku pro tři pozorování.

Tabulka 11

Vlivy inhibitorů cysteinové proteasy na dusíkaté frakce siláže

Ošetření	Celkový N gN/kg DM	Nebílkovinný N gN/kgN	Amoniakální N gN/kgN
Kontrola	407	643	72,4
E-64 (22,5 /ug/g trávy)	366	556	70,8
Cystatin (1,2 /ug/g trávy)	406	571	75,7
Antipain (32 /ug/g trávy)	411	524	69,1
SE	1,02	2,40	0,76

Legenda k tabulce 11:

DM znamená sušinu,
SE znamená standardní odchylku pro tři pozorování.

Obsah rozpustného dusíku byl v silážích ošetřených cystatinem snížen na 88 % rozpustného dusíku kontroly. Obsah rozpustného dusíku byl v siláži ošetřené antipainem snížen na 81 % rozpustného dusíku kontroly.

Tabulka 12

Vlivy inhibitorů cysteinové proteasy na složení siláže

Ošetření	pH siláže	DM	WSC	La	Ac	Eth
Kontrola	3,48	156	20,5	184	22,5	10,0
E-64 (22,5 /ug/g trávy)	3,48	163	24,2	190	22,2	33,3
Antipain (32 /ug/g trávy)	3,55	161	24,1	163	28,8	4,31
Cystatin (1,2 /ug/g trávy)	3,65	160	17,2	183	29,4	4,55
SE	0,03	3,09	0,93	19,2	8,57	5,07

Legenda k tabulce 12:

DM znamená sušinu v gramech na kilogram a
WSC znamená vodou rozpustné uhlohydráty,
La znamená kyselinu mléčnou,
Ac znamená kyselinu octovou,
Eth znamená ethanol,
vše vyjádřeno v gramech na kilogram sušiny, a
SE znamená standardní odchylku pro tři pozorování.

Tabulka 13

Vlivy E-64 a ´ECOSYL´u na dusíkaté frakce siláže

Ošetření	Celkový N gN/kg DM	Nebílkovinný N gN/kgN	Amoniakální N gN/kgN
Kontrola	407	643	72,4
E-64 (22,5 /ug/g trávy)	366	586	70,8
´ECOSYL´ (8,55 /ug/g trávy)	378	533	63,2
E-64 (22,5 /ug/g trávy) a ´ECOSYL´ (8,55 g/l)	355	421	53,3
SE	0,79	1,51	0,79

Legenda k tabulce 13:

DM znamená sušinu,
SE znamená standardní odchylku pro tři pozorování.

U siláže ošetřené ´ECOSYL´em bylo množství rozpustného dusíku sníženo na 82 % rozpustného dusíku kontroly. U siláže ošetřené E-64 a ´ECOSYL´em bylo zjištěno větší snížení obsahu rozpustného dusíku ve srovnání s oddělenou aplikací každého ošetření. Při společném přidání ´ECOSYL´u a E-64 se obsah rozpustného dusíku v siláži snížil na 65 % rozpustného dusíku kontroly.

Tabulka 14

Vlivy E-64 a ´ECOSYL´u na složení siláže

Ošetření	pH siláže	DM	WSC	La	Ac	Eth
Kontrola	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
E-64 (22,5 /ug/g trávy)	3,48	163	24,1	188	22,2	33,3
´ECOSYL´ (8,55 /ug/g trávy)	3,63	154	16,0	149	42,6	11,2
´ECOSYL´ (8,55 /ug/g trávy) a E-64 (22,5 /ug/g trávy)	3,45	164	28,9	132	42,0	30,2
SE	0,03	0,11	0,92	13,9	8,53	5,45

Legenda k tabulce 14:

DM znamená sušinu v gramech na kilogram a
WSC znamená vodou rozpustné uhlohydráty,
La znamená kyselinu mléčnou,
Ac znamená kyselinu octovou,
Eth znamená ethanol,
vše vyjádřeno v gramech na kilogram sušiny, a
SE znamená standardní odchylku pro tři pozorování.

Závěry:

Výsledky ukazují, že během silážování jsou aktivní cysteinové a asparagové proteasy. Přidání specifických in-

hibitorů cysteinové a asparagové proteasy, biologického původu, snížilo rozsah proteolýzy v sile, aniž by nepříznivě ovlivňovalo produkci mléčné kyseliny v sile.

Snížení obsahu rozpustného dusíku u siláží ošetřených ´ECOSYL´em ve srovnání s obsahem u kontrolních siláží lze přičítat vlivu pH na proteolytické enzymy jílku vytrvalého (tyto vykazují nejvyšší aktivitu při pH 5 až 7); očekává se rychlejší snížení pH v počátečních stadiích silážování u siláží ošetřených ´ECOSYL´em ve srování s kontrolními silážemi.

Zdá se, že kombinace inhibitorů cysteinové a asparagové proteasy nebo inhibitoru cysteinové proteasy a ´ECOSYL´u snižuje proteolýzu v sile ve větším rozsahu než ošetření pouze jedním činidlem.

277-93

NOVÉ NÁROKY

171094/ST

ADVOKÁTI A PATENTOVÁ KANCELÁŘ
17000 Praha 7, U průhonu 46

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
25. 11. 93
DOŠLO
č.j. 0081 46

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Silážní přísada, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje účinnou složku pro silážování plodiny a alespoň jeden inhibitor enzymu proteasy, vybraný ze skupiny zahrnující inhibitory cysteinové proteasy a inhibitory asparagové proteasy, přičemž tento inhibitor či tyto inhibitory jsou biologického původu.

2. Přísada podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že účinnou složkou je kyselina nebo složka bakteriálního původu.

3. Přísada podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že bakteriální složkou je mléčnou kyselinu produkující kmen Lactobacillus nebo/a Streptococcus nebo/a Pediococcus.

4. Přísada podle libovolného z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že inhibitorem cysteinové proteasy je cystatin nebo antipain nebo trans-epoxy-sukcinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butan.

5. Přísada podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že trans-epoxy-sukcinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butan se vyrobí podle HANADAy a kol., Agric. Biol. Chem. 42 (3) 529 až 536 (1978).

6. Přísada podle libovolného z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že inhibitorem asparagové proteasy je pepstatin.

7. Přísada podle libovolného z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je v ní přítomen jak inhibitor enzymu cysteinové proteasy tak enzymu asparagové proteasy.

8. Přísada podle libovolného z nároků 1 až 7 v kapalném nosiči, který obsahuje vodu.

9. Způsob výroby siláže, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se plodina silážuje v přítomnosti alespoň jednoho inhibitoru enzymu proteasy, vybraného ze skupiny zahrnující inhibitory cysteinové proteasy a inhibitory asparagové proteasy, přičemž tento inhibitor či tyto inhibitory jsou biologického původu.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se inhibitor cysteinové proteasy aplikuje na čerstvě posekanou trávu předtím, než je silážována.

11. Způsob podle nároku 9 nebo nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se inhibitor cysteinové proteasy aplikuje v rozmezí 10 až 130 umol / kg plodiny.

12. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se inhibitor asparagové proteasy aplikuje v rozmezí 1 až 60 mg / kg plodiny.

13. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že v době aplikace inhibitoru do plodiny je pH v rozmezí 3 až 7,5.

14. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aplikuje kapalná přísada obsahující inhibitor proteasy v množství od 1 gramu do 100 gramů na litr v nosiči obsahujícím vodu, v dávce v rozmezí 0,5 až 5 litrů na tunu ošetřované píce.

15. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se siláž vyrábí fermentací trav, obilovin, leguminóz nebo rýže.

16. Siláž vyrobená způsobem podle libovolného z nároků 9 až 15 nebo za použití přísady podle libovolného z nároků 1 až 8.

JUDr Jarmila Trnková