



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

(11) DD 291 688 A5

5(51) A 23 K 3/02
C 12 N 9/00
C 12 K 19/00
C 13 K 1/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 23 K / 337 597 0	(22)	05.02.90	(44)	11.07.91
(71)	VEB Industrieforschungszentrum Berlin, Alt-Stralau 55, O - 1017 Berlin, DE				
(72)	Tischler, Michael, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Echtermann, Klaus-Werner, Dipl.-Chem.; Robowsky, Klaus-Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Knabe, Otto, Prof. Dr. sc. Dipl.-Landw.; Schulz, Günter, Dr. sc. nat.; Flamme, Wilhelm, Prof. Dr. sc. Dipl.-Chem., DE				
(73)	VEB Industrieforschungszentrum Berlin, O - 1017 Berlin; Institut für Futterproduktion, O - 1551 Paulinenaue; Humboldt-Universität zu Berlin, O - 1086 Berlin; Institut für Pflanzenzüchtung, O - 2601 Gülzow - Güstrow, DE				
(54)	Verfahren zur Anwendung eines spezifischen Enzymkomplexes zur Silierung von Grünfutter				

(55) Verfahren; Silierung; Grünfutter; Enzymkomplex; Angärung; pH-Wert, Verzuckerung; Landwirtschaft; Futtermittelindustrie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anwendung eines spezifischen Enzymkomplexes zur Silierung von Grünfutterstoffen. Es bestand die Aufgabe, mit Hilfe eines einzigen Enzymkomplexes eine Beschleunigung der Angärung und pH-Absenkung durch Bereitstellung der für die anaerobe milchsäure Fermentation notwendigen Saccharide bei zeitlich und quantitativ limitierter Verzuckerung der Strukturkohlenhydrate des Siliergutes zu erreichen. Erfindungsgemäß wird ein spezifischer Enzymkomplex angewendet, der in seiner Zusammensetzung auf die zu silierenden Futtermittel abgestimmt ist und über Cellulase, Hemicellulase, Amylase, Pectinase, β -1,3-Glucanase, Cellobiase und Protease verfügt und aus Mikroorganismen-Kulturen, vorzugsweise Fungi der Gattung Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, insbesondere Penicillium janthinellum oder Pflanzen wie Enzymtriticale gewonnen wird. Das Verfahren wird in der Landwirtschaft und Futtermittelindustrie angewendet.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Anwendung eines spezifischen Enzymkomplexes zur Silierung von Grünfütter bei Temperaturen von 293...318K und pH-Werten von 6,0...3,0 bei zeitlich und quantitativ limitierter Verzuckerung der Strukturkohlenhydrate durch pH-Inhibition, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein einziger auf die Siliergutzusammensetzung abgestimmter spezifischer Enzymkomplex zum Einsatz kommt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex Cellulasen mit hohem Cellobiase- bzw. β -Glucanase-Anteil, Hemicellulasen mit Wirkung auf verzweigte und unverzweigte Pentosane, Amylasen mit hohem Glucoamylase-Anteil zur Hydrolyse von Oligo- und Disacchariden, Pectinasen, β -1,3-Glucanase und Protease enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex in festem (pulvrigem oder granuliertem) oder flüssigem (Kulturfiltrat, -konzentrat, Ultrafiltrat) Zustand bei natürlichem pH-Wert des Siliergutes bei Siliertemperatur durch Einsprühen, Einstreuen, Berieseln appliziert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex als Produkt der Kultivierung von Mikroorganismen oder Pflanzen in Form von oder extrahiert aus Enzymtriticale oder an gemahlenem geschrotetem Enzymtriticale, Getreide oder Malz natürlich oder synthetisch chemisch und/oder physikalisch gebunden eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß dabei maximal 40%mas (bezogen auf den Gesamteinsatz des Siliergutes), vorzugsweise 1 bis 20%mas Enzymtriticale eingesetzt werden mit einer Fallzahl < 140 sec., einer amyolytischen Aktivität von > 55 SKB-Einheiten und einer Alpha-Amylaseaktivität von > 15 ICC-Einheiten. Die Korngröße des Schrottes beträgt mindestens 50%, vorzugsweise > 85% < 1 mm.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex als Produkt der Kultivierung von Mikroorganismen der Gattungen Aspergillus, Trichoderma oder Penicillium, vorzugsweise Penicillium janthinellum, insbesondere der Stämme IMET 43733, IMET 43903, IMET 43904, IMET 43905 eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß beide Applikationsformen wie mikrobielles Verzuckerungsmittel und Zusatz enzymreicher Getreideprodukte kombiniert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex mit Starterkulturen von Milchsäurebakterien (z. B. Lactobacillus) kombiniert wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß der spezifische Enzymkomplex mit Glucoseoxydase zur Entfernung des Sauerstoffes aus dem Siliergut kombiniert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Dieses Verfahren wird bei der Silierung von Grünfütter und anderem Siliergut in der Landwirtschaft angewandt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Konservierung von pflanzlichem Material durch biologische Säuerung ist seit langem bekannt. Das Prinzip besteht darin, daß das organische Material durch anaerobe Milchsäuregärung und/oder durch Ansäuerung mit entsprechenden Chemikalien eine rasche pH-Absenkung erfährt und dadurch die Entwicklung Fäulnis oder Fremdgärungen (z. B. Buttersäurefermentationen) erregender Mikroorganismen unterdrückt wird. Die erwünschte Milchsäurefermentation wird von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst, wie z. B. von der Art und dem Titer der natürlichen Milchsäurebakterien, der Art, der chemischen Zusammensetzung – insbesondere dem Kohlenhydratgehalt und der Beschaffenheit (TS-Gehalt) des Siliergutes, Siliertechnologie, Gärbedingungen. Entscheidend für den Erfolg dieses Konservierungsverfahrens ist die Geschwindigkeit der Säuerung, um schädliche Mikroorganismen zu unterdrücken. Zum Erreichen dieser Ziele werden in der Literatur zahlreiche Verfahren genannt, die wie folgt systematisiert werden können (Vgl. auch DD-WP 221068):

1. Förderung bzw. Stimulierung der Milchsäurefermentation durch Zusatz von (homofermentativen) Milchsäurebakterien-Kulturen mit 10^5 – 10^7 CFU (Colony forming units)/g Siliergut und/oder von Zuckern oder zuckerhaltigen Futterstoffen. Das Siliergut besitzt jedoch eine umfangreiche mikrobielle epiphytische Wildflora, die vor dem Silieren nicht beseitigt werden kann und daher den Effekt der zugesetzten (homofermentativen) Bakterienkulturen wechselhaft beeinflusst. Von den zuzusetzenden Kulturen sind Säure-, Thermo- und Osmotoleranz sowie genetische Stabilität zu fordern.
2. Direkte Ansäuerung durch organische und/oder anorganische Säuren bzw. deren Salze und Ester (vgl. DD-WP 114343, DD-WP 118521, DD-WP 122372). Hierzu rechnet auch der Zusatz von chemischen Siliermitteln zur Verhinderung unerwünschter mikrobieller Umsetzungen. Probleme des Arbeits- und Umweltschutzes sowie der Korrosion, insbesondere bei Anwendung konzentrierter Säuren sind zu beachten.

3. Zusatz von vor allem mikrobiellen Enzymen oder Enzymgemischen aus Alpha-Amylase, Glucoamylase, Cellulase, Hemicellulasen in Kombination mit stärkehaltigen Trägern. Hiermit werden hochpolymere biologische Substanzen des Trägers bzw. des Siliergutes in z. T. vergärbare Kohlenhydrate umgewandelt (vgl. F-PS 2039908, F-PS 3005020, DD-WP 132 102, DD-WP 149015 und KNABE, O., ROBOWSKY, K.-D., MUELLER, Th., WEISE, G., SEYFARTH, W.: „Anwendung biologischer Siliermittel für Grobfutter“, Tierzucht 41 [1987], 467-469). Die Anwendung von Einzelenzymen in Form von Mischungen konnte bisher noch keine umfassende Wirkung erbringen.

4. Zusatz von vermälztem und unvermälztem Getreide, mit dem vergärbare Kohlenhydrate gebildet werden sollen (DR-PS 1 492 903, DE-OS 2 700 644, US-PS 3 968 259). Die Bildung vergärbaren Zucker ist dabei von der diastatischen Kraft des Malzes bzw. vom Enzympotential des Getreides abhängig. Bei Zusatz von Getreide wird eine schnelle Bildung vergärbaren Saccharide nicht immer erreicht.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Anwendung von chemischen Siliermitteln (Ameisensäure, Mineralsäuren u. a.) teilweise eine optimale Konservierung des Siliergutes bewirkt, jedoch bei deren Anwendung Probleme des Arbeits- und Umweltschutzes sowie der Korrosion bestehen. Biologische Siliermittel und Impfkulturen überwinden diese Probleme. Die bisher bekannten Einzelenzyme bzw. Enzymgemische garantieren derzeit noch keine reproduzierbare Stabilisierung der Milchsäuregärung durch Beschleunigung der Anfangsgärphase und damit verbundene pH-Absenkung, da eine Adaptation an die spezifischen Eigenschaften des Siliergutes nicht vorgenommen wurde. Ein Enzymkomplex, der die o. g. Anforderungen erfüllt, wurde noch nicht beschrieben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, eine reproduzierbare Stabilisierung der Milchsäurefermentation durch beschleunigte Angärung und damit verbundene pH-Absenkung zu erreichen, woraus eine Verringerung der Verluste, eine Erhöhung der Silagequalität und -verdaulichkeit sowie der Tiergesundheit und Rohmilchqualität resultiert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur raschen Bildung für Milchsäurebakterien vergärbaren Kohlenhydrate zur Sicherung einer schnellen Angärung und damit verbundenen pH-Absenkung des Siliergutes vorzulegen. Eine Limitierung der Hydrolyse von Strukturkohlenhydraten des Siliergutes ist erforderlich, um die Sickersaftbildung zu begrenzen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Anwendung eines spezifischen Enzymkomplexes zur Silierung von Grünfütter mit auf das Siliergut abgestimmten Eigenschaften bei Temperaturen von 293...318 K und pH-Werten von 6,0...3,0 bei zeitlich und quantitativ limitierter Verzuckerung der Strukturkohlenhydrate durch pH-Inhibition erreicht. Der spezifische Enzymkomplex enthält Cellulasen mit hohem Cellobiase- bzw. β -Glucanase-Anteil, Hemicellulasen mit Wirkung auf verzweigte und unverzweigte Pentosane, Amylasen mit hohem Glucoamylase-Anteil zur Hydrolyse von Oligo- und Disacchariden, Pectinasen, β -1,3-Glucanase und Protease. Der spezifische Enzymkomplex wird in festem (pulvrigen oder granuliertem) oder flüssigem (Kulturfiltrat, -konzentrat, Ultrafiltrat) Zustand bei natürlichem pH-Wert des Siliergutes bei Siliertemperatur durch Einsprühen, Einstreuen, Berieseln appliziert. Der spezifische Enzymkomplex kann sowohl als Produkt der Kultivierung von Mikroorganismen als auch aus Pflanzen in Form von oder extrahiert aus Enzymtriticale oder an gemahlenem, geschrotetem Enzymtriticale, Getreide, Malz natürlich oder synthetisch chemisch und/oder physikalisch gebunden eingesetzt werden. Dabei werden maximal 40%mas (bezogen auf den Gesamteinsatz des Siliergutes), vorzugsweise 1 bis 20%mas Enzym-Triticale eingesetzt mit einer Fallzahl < 140 sec., einer amyolytischen Aktivität von > 55 SKB-Einheiten und einer Alpha-Amylaseaktivität von > 15 ICC-Einheiten. Die Korngröße des Schrottes beträgt mit 50% < 1 mm. Der spezifische Enzymkomplex kann als Produkt der Kultivierung von Mikroorganismen der Gattungen Aspergillus, Trichoderma oder Penicillium, vorzugsweise Penicillium janthinellum, insbesondere der Stämme IMET 43733, IMET 43903, IMET 43904, IMET 43905 eingesetzt werden.

Beide Applikationsformen, d. h. der Einsatz eines mikrobiellen Verzuckerungsmittels für die Bildung vergärbaren Mono- und Disaccharide und der Einsatz von enzymreichen Getreideprodukten können kombiniert werden und führen so zu besonders hohen Anfangsgärleistungen. Der spezifische Enzymkomplex kann mit Starterkulturen von Milchsäurebakterien (z. B. Lactobacillus) kombiniert werden. Der spezifische Enzymkomplex kann mit Glucoseoxydase zur Entfernung des Sauerstoffes aus dem Siliergut und damit verbundenen Gewährleistung anaerober Fermentationsbedingungen kombiniert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Bei der Herstellung von Silage wird das Siliergut, bestehend aus Luzerne, Rotklee, Futtergräsern, Grüngetreide und/oder Mais (150 bis 400 g/kg Trockensubstanz) mit 2 bis 8 l einer Lösung oder Suspension des spezifischen Enzymkomplexes in Wasser je t frischem oder gewerktem Siliergut während des Häcksels besprüht. Die Enzymdosierung beträgt so 10^3 bis 50^3 FPU/t Siliergut, (Filterpapiersaccharifizierende Enzymaktivität nach MANDELS et al. [1969]). Die Enzymaktivitäten des eingesetzten spezifischen Komplexes sind bezogen auf Protein:

FPS-Aktivität	U/g	316
CMCL	g NaCMC/g	$1,39 \cdot 10^6$
Cellobiase	U/g	963
Xylanase	U/g	15 439
Xylobiase	U/g	215
Glucoamylase	E/g	8 500
Mannanase	U/g	409
Protease	TE _{cas} /g	200
Lichenase	U/g	$3,1 \cdot 10^4$
Laminarinase	U/g	4 540

Nach Beginn der Milchsäurefermentation erfolgt durch den Enzymzusatz ein pH-Abfall von 5,9 auf 4,2 in 7 Tagen (Kontrolle ohne Enzym: pH 5,0) und eine Milchsäurebildung von 70 g/kg TS (Kontrolle: 39 g/kg TS). Am Ende des Sillerprozesses ist eine Milchsäurekonzentration von 140 bis 170 g/kg TS Silage erreicht (Kontrolle: 5,2 g/kg TS Silage). Die Buttersäuregehalte betragen bei der enzymbehandelten Silage: 0 g/kg TS und in der Kontrolle 20–40 g/kg TS Silage. Durch den Zusatz des spezifischen Enzymkomplexes wurde die Milchsäuregärung gefördert, die Buttersäurebildung verhindert und der Proteinabbau zu Ammoniak gehemmt.

Beispiel 2

1000 kg Siliergut aus Luzerne mmmt 230 g/kg TS wird mit 20% mas Triticaleschrot (Korngröße 88% < 1 mm, Fallzahl 110 Sekunden, amylytische Aktivität 49 SKB-Einheiten, Alpha-Amylaseaktivität 16 ICC-Einheiten) versetzt. Dabei wird das Triticaleschrot schichtweise eingestreut. Nach 3 Tagen ist im Siliergut ein pH-Abfall festzustellen. Nach Ende der Silierung ist ein Milchsäuregehalt von ≥ 120 g/kg Silage vorhanden. Die Silage ist buttersäurefrei und besitzt einen fruchtig-aromatischen Geruch.

Beispiel 3

100 kg Enzymtriticale werden bei 298 bis 318 K mit dem 3fachen Volumen wäßrig extrahiert, der Extrakt thermisch oder mechanisch durch Membrantrennverfahren eingeengt, und das dabei entstehende Konzentrat bei der Einbringung des Siliergutes in einem Volumen von 2–8 auf 1000 kg Pflanzen gesprüht. Das zurückbleibende Getreide wird der Fütterung zugeführt oder als Kohlenhydratquelle schichtenweise dem Siliergut zugegeben. Der pH-Wert der Silage verändert sich nach 3 Tagen auf $\leq 4,0$; die Silage besitzt eine Milchsäurekonzentration von ≥ 120 g/kg.

Beispiel 4

Angewendet wird ein Kombinationspräparat, in dem der im Beispiel 1 genannte spezifische Enzymkomplex zusammen mit einer lyophilisierten Milchsäurebakterienkultur wirbelschichtgranuliert ist und das 190 FPU und $4 \cdot 10^9$ CFU (colony forming units)/g Präparat enthält. Dieses Präparat wird mit einer Dosierung von 50 bis 180, vorzugsweise 120 g/t Siliergut direkt bei der Befüllung des Silos eingestreut oder in einem Volumen von 1 bis 5 l Wasser gelöst bzw. suspendiert auf das Siliergut aufgesprüht. Es erfolgt nach der Angärung eine pH-Veränderung auf ≤ 4 innerhalb von 3 Tagen und der Milchsäuregehalt nach 90 Tagen Siliierprozeß beträgt ≥ 120 g/kg Siliergut.