



SUOMI—FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

**[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 66282**

C (45) *Patent* 1981
Patent

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ A 23 K 3/00

(86) Kv. hakemus — Int. ansökan

(21) Patentihakemus — Patentansökan 823736

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 02.11.82

(23) Aikupäivä — Giltighetsdag 02.11.82

(41) Tulut julkiseksi — Blivt offentlig 03.05.84

(44) Nähtävöityminen ja kuul.julkaisu pvm. —
Ansökan utlagd och utskriften publicerad 29.06.84

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet

(71) VALIO Meijerien Keskusosuusliike, PL 390, 00101 Helsinki 10,
Suomi-Finland(FI)

(72) Matti Heikonen, Espoo, Tauno Moisio, Helsinki, Matti Harju, Nummela,
Suomi-Finland(FI)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Menetelmä tuorerehun tai kokoviljan säilömiseksi - Förfarande för
ensilering av grönfoder eller fullsäd

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää nurmirehun tai kokoviljan säilöntään. Menetelmän tarkoitus on saada aikaan säilöntään tarvittava pH ainakin pääasiassa entsymaattisesti lisäämällä säilöttävään rehuun tai kokoviljaan glukoosioksidaasia rehuun tai kokoviljaan sisältyvän glukoosin muuttamiseksi pH:ta alentavaksi glukonihapoksi. Rehuun tai kokoviljaan voidaan myös lisätä sellulaasia, hemisellulaasia tai β -glukosidaasia glukoosin tuottamiseksi.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för ensilering av grönfoder eller fullsäd. Förfarandet har till ändamål att åstadkomma för ensileringen erforderligt pH åtminstone huvudsakligen på enzymatisk väg genom att i fodret eller fullsäden tillsätta glukosoxidas för omvandling av i fodret eller fullsäden ingående glukos till pH sänkande glukonsyra. I fodret eller fullsäden kan även tillsättas cellulas, hemicellulas eller β -glukosidas för bildande av glukos.

Menetelmä tuorerehun tai kokoviljan säilömiseksi

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään tuorerehun tai kokoviljan säilömiseksi.

Kun niitetty rehumassa suljetaan ilmanpitävään säilöön, rehun helppoliukoiset hiilihydraatit käyvät edullisimmassa tapauksessa maitohapoksi, ja syntynyt maitohappo alentaa rehun pH:n arvoon 4 tai sen alle. A.I. Virtasen tuunettujen tutkimusten perusteella tiedetään, että rehumassan pH:n alentuessa arvoon 4 tai sen alle estyvät sellaiset rehun laatuun vaikuttavat biologiset tapahtumat kuin hengitys, valkuaisaineiden hajoaminen ja voihappokäyminen.

Tunnetun AIV-menetelmän mukaan rehumassan riittävän alhainen pH varmistetaan lisäämällä happoja. Tällöin siis riittävä happamuus saavutetaan ilman, että rehun omia hiilihydraatteja kulutetaan maitohapon muodostukseen. Helppoliukoiset hiilihydraatit voidaan näin säästää märehtijän omassa ruoansulatusjärjestelmässä hyödynnettäviksi.

Mikäli kuitenkin rehun säilyttäminen halutaan tehdä rehumassan maitohappokäymisellä, muttei haluta kuluttaa liikaa rehun omia helppoliukoisia hiilihydraatteja, voidaan rehuun lisätä melassia, heraa tai jotakin muuta helppoliukoista hiilihydraattia maitohappokäymisen raaka-aineeksi.

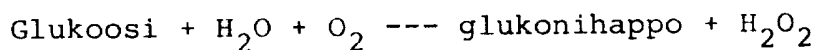
On myös tunnettua, että eräs mahdollisuus riittävän helppoliukoisen hiilihydraattimäärän säilyttämiseksi rehumassan maitohappokäymisessä on tuottaa rehun omasta selluloosasta sellulaasiseoksilla liukoisia hiilihydraatteja. Käytettävä sellulaasi voi olla peräisin esimerkiksi *Aspergillus niger*'istä, *Aspergillus oryzae*'sta tai *Tricoderma reesei*'sta. Sellulaasi-valmisteita voidaan käyttää myös happoperustaisessa AIV-rehusäilönnässä lisäämään rehumassan helppoliukoisten sokerien määrää. Riittävän glukoosituotannon kannalta on tärkeätä,

että käytettävä entsyymiseos sisältää sellulaasin ohella myös hemisellulaasia ja β -glukosidaasia [Väistö, T., Heikonen, M., Kreula, M. ja Linko, T., J.Sci.Agr.Soc. 50 (1978) 392-397].

Vaikka rehun käymiskykyisten hiilihydraattien määrää lisättäisiin sellulaasivalmisteilla, riittävä maitohappokäyminen saattaa silti olla epävarmaa. Tämän vuoksi on sellulaasipreparaatteja käytettäessä säilönnän yhteydessä lisätty orgaanisia tai epäorgaanisia happoja, esimerkiksi muurahaishappoa 2 litraa tonniin rehua, ja täten varmistettu maitohappokäyminen. Eräs toinen mahdollisuus on lisätä rehuun sopivia maitohappobakteeripreparaatteja.

Keksintö perustuu siihen tunnettuun seikkaan, että glukosista saadaan glukosioksidaasi-entsyymillä (GOD) glukonihappoa seuraavan kaavan mukaan:

GOD



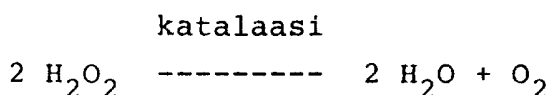
Muuttamalla rehuun tai kokoviljaan sisältyvä glukoosi glukosioksidaasilla glukonihapoksi edellä esitetyn kaavan mukaisesti voidaan täten pH alentaa säilöntää varten haluttuun arvoon ainakin pääasiassa yksinomaan entsymaattisesti.

Keksintö kohdistuu näin ollen menetelmään nurmirehun ja kokoviljan säilöntään, jossa menetelmässä silputtuun nurmirehuun tai kokoviljaan lisätään niiton tai säilöönpanon yhteydessä 10 000 - 10 000 000 IU glukosioksidaasia tonnia kohti rehun tuorepainoa tai kokoviljaa rehuun tai kokoviljaan sisältyvän glukoosin muuttamiseksi rehun tai viljan pH:ta säilöntää varten haluttuun arvoon alentavaksi glukonihapoksi ja hapen kuluttamiseksi.

Glukosioksidaasiaktiivisuuden määrittämisen mukaan kansainvälinen yksikkö IU on se entsyymimäärä, joka aiheuttaa 10 μ l:n hapen kulutuksen minuutissa, kun substraattina on 3,3 % glukoosi fosfaattipuskurissa pH 5,9, lämpötila on 35°C ja happea on ylimäärin.

Glukoosioksidaasin mukana voidaan rehuun tai kokoviljaan lisätä myös sellulaasia, hemisellulaasia ja/tai β -glukosidaasia glukoosin tuottamiseksi sinänsä tunnetulla tavalla.

Glukonihapon muodostumisen yhteydessä syntynyt vetyperoksidi hajoaa rehumassassa olevan katalaasin vaikutuksesta vedeksi ja hapeksi:



Vapautunut happi palautuu kiertoon ja kuluu vähitellen loppuun. Hapen poistaminen prosessin yhteydessä on myös tärkeätä säilönnän onnistumisen kannalta, sillä täten voidaan laimuttaa rehumassan aerobinen ja samalla sokereita kuluttava hengitys sekä estää homeiden kasvu.

Keksinnön erään sovellutusmuodon mukaan lisätään täten rehuun tarvittaessa myös katalaasia glukonihapon muodostumisen yhteydessä syntyvän vetyperoksidin muuttamiseksi hapeksi ja vedeksi. Tämä voidaan esimerkiksi saada aikaan käyttämällä glukoosioksidaasia, joka sisältää katalaasiaktiivisuutta siten, että rehuun tai kokoviljaan lisätään glukoosioksidaasin mukana 500 - 5 000 000 Baker-yksikköä katalaasia tonnia kohti rehun tai kokoviljan tuorepainoa.

Katalaasiaktiivisuuden määrittäminen Baker-yksikköinä on esitetty artikkelissa Scott, D. ja Hammer, F.: *Enzymologia* 22 (1960), 194-200.

Maitohappokäymisen varmistamiseksi entsyymien mukana voidaan rehuun tai viljaan myös lisätä sinänsä tunnettu maitohappokäymistä edistävä maitohappobakteeripreparaatti sekä heraa, laktoosin suhteen hydrolysoitua heraa, melassia tai muita sokereita väkevöitynä liuoksena tai kuivattuina. Edelleen voidaan entsyymien mukana lisätä sinänsä tunnettuja virhehämmästä estäviä suoloja, kuten formiaattia ja/tai bentsoaattia ja/tai nitriittiä.

Mikrobien kasvu biologisessa materiaalissa on riippuvainen veden aktiivisuudesta. Monille haitallisille bakteereille veden aktiivisuus ei saa olla alle 0,90-0,95. Säilörehun vedenaktiivisuuteen voidaan vaikuttaa paitsi rehun esikuiva-

tuksella myös lisäämällä rehuun suoloja, sokereita tai vettä sitovia aineita. Koska märehitijän ruokinnassa on joka tapauksessa käytettävä suolalisäyksiä, on täten edullista käyttää suolat hyväksi jo säilöntävaiheessa. Säilönnän kannalta liisättävät suolat ovat reaktioltaan parhaita happamina. Esimerkkinä sopivista suoloista voidaan mainita magnesium-, kalsium- ja ureafosfaatti, kalsium- ja natriumformiaatti ja natriumkloridi.

Glukoosioksidaasin aktiivisuuden kannalta on myös edullista, että rehumassan pH on alusta alkaen hieman laskettu. Edellä mainitut happamat suolat saavat aikaan tällaisen vaikutuksen. Mikäli säilönnän yhteydessä ei käytetä happamia suoloja, voidaan lisätä orgaanisia happoja, kuten muurahais-, etikka-, maito- tai glukonihappoa, tai mineraalihappoja, kuten rikki-, suola- tai fosforihappoa. Lisätty määrä on kuitenkin huomattavasti pienempi kuin normaalissa AIV-säilönnässä, esimerkiksi muurahaishappoa käytettäessä lisätty määrä voi olla 1-2 litraa rehutonnia kohti.

Glukoosioksidaasilla glukoosista saatu glukonihappo on eittoksinen eikä aiheuta tavallisissa pitoisuuksissa eläimissä ruuansulatuselinten ärsytystä. Glukoosioksidaasi ja glukonihappo ovat elintarvikkeiden yleisesti hyväksytyjä lisäaineita mm. säilöntätarkoituksiin. Glukonihappo alentaa myös tehokkaasti rehun pH:ta, sillä sen pH on 1-prosenttisena vesiliuoksena noin 2,8.

Keksinnön havainnollistamiseksi esitetään seuraavat esimerkit.

Esimerkki 1

Vastaleikattuun ruohoon lisättiin 0,005 % glukoosioksidaasivalmistetta ruohon tuorepainosta. Glukoosioksidaasivalmisteen aktiivisuus oli 11250 IU/ml. Taulukossa 1 on esitetty glukonihapon muodostus ja pH:n lasku ensimmäisen vuorokauden kuluessa.

Taulukko 1

Glukonihapon muodostus ja pH:n lasku nurmisäilörehussa vuorokauden kuluttua säilönnästä

	<u>Glukonihappopit. (%)</u>	<u>pH</u>
Nollakoe	0,01	6,3
0,005 % glukoosi- oksidaasia	1,20	5,1

Esimerkki 2

Vastaleikattuun ruohoon (timotei) lisättiin taulukon 2 mukaiset määrät happoa, sellulaasia ja glukoosioksidaasia.

Taulukko 2

Koerehujen säilöntäainekoostumus. Määrät ovat prosentteina rehun tuorepainosta.

	<u>Koerehu</u>				
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
AIV II-liuos (%)	0	0,5	0	0	0
Sellulaasi (%)	0	0,014	0,014	0,05	0
Glukoosioksidaasi (%)	0	0,003	0,003	0,01	0,01

Happona käytettiin AIV II-liuosta (80 % muurahaishappoa, 2 % fosforihappoa). Sellulaasivalmisteen HEC-aktiivisuus oli 32 000 yks/ml ja β -glukosidaasiaktiivisuus 1500 nkat/ml. Glukoosioksidaasivalmiste oli sama kuin esimerkissä 1.

Sellulaasin ja β -glukosidaasin aktiivisuusyksiköt ja -määrittämenetelmät on esitetty artikkelissa Bailey, M. ja Nevalainen, K.: Enzyme Microb. Technol. 3 (1981), 153-57.

Taulukossa 3 on esitetty puristenesteestä määritetyt säilörehun laatua kuvaavat suureet vuorokauden kuluttua säilönnästä. Taulukossa 4 on vastaavat tulokset kuukauden kuluttua ja taulukossa 5 kahden kuukauden kuluttua.

Taulukko 3

Koerehujen puristenesteiden analyysitulokset vuorokauden säilytyksen jälkeen.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
pH	6,6	4,0	5,6	5,2	5,2
Sokeripit. (g/l)	15	20	15	20	15
Kok.happamuus maitohappona (g/l)	3,1	14,0	6,3	8,2	8,4
Ammoniakkipi- toisuus (g/l)	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1

Taulukko 4

Koerehujen puristenesteiden analyysitulokset kuukauden säilytyksen jälkeen.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
pH	6,6	4,5	4,5	4,3	5,0
Sokeripit. (g/l)	0	12,5	0	2,5	2,5
Maitohappo- pitoisuus (g/l)	0,8	1,4	12,5	30,6	13,2
Glukonihappo- pitoisuus (g/l)	0	3,8	0	0	0,03
Voihappopit. (g/l)	0	0	0	0	0
Kokonaishappamuus maitohappona (g/l)	5,4	11,3	23,0	27,9	10,4
Ammoniakki (g/l)	0,8	0,4	0,6	0,8	0,8

Taulukko 5

Koerehujen puristenesteiden analyysitulokset kahden kuukauden säilytyksen jälkeen.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
pH	5,3	4,2	4,6	4,1	5,0
Sokeripit. (g/l)	0	2,5	0	0	0
Maitohappo- pitoisuus (g/l)	1,4	7,4	7,9	14,2	16,5
Glukonihappo- pitoisuus (g/l)	0	1,1	0	0	0
Voihappopitoi- suus (g/l)	0,8	0,1	0	0	0
Kok.happamuus maitohappona (g/l)	13,7	21,2	27,0	30,6	13,1
Ammoniakki (g/l)	2,0	0,4	0,6	0,4	0,8

Taulukosta 3 nähdään, että glukoosioksidaasilisäys alentaa rehun pH:n nopeasti ja samalla luonnollisesti poistaa hapen. Taulukosta 4 ja 5 nähdään, että sellulaasi on lisännyt käymiskelpoisten sokerien määrää, koska pH on selvästi alhaisempi ja kokonaishappamuus suurempi entsyymikäsitellyissä rehuissa verrattuna nollakokeeseen. Entsyymilisäys on myös taulukon 5 mukaisesti estänyt haitallista voihiappokäymistä ja proteiinien pilkkoutumista ammoniakiksi.

Esimerkki 3

Vastaleikattuun ruohoon lisättiin hapanta suolaseosta (magnesium-, kalsium- ja ureafosfaatin, kalsium- ja natriumformiaatin sekä natriumkloridin seos), sellulaasia ja glukoosioksidaasia taulukon 6 mukaisesti.

Taulukko 6

Koerehujen säilöntäainekoostumus (% tuorepainosta)

	<u>Koerehu 1</u>	<u>Koerehu 2</u>
Hapan suolaseos (%)	0,4	0,4
Sellulaasi (%)	0	0,05
Glukoosioksidaasi (%)	0	0,005

Sellulaasi- ja glukoosioksidaasivalmisteet olivat samoja kuin esimerkissä 1. Taulukossa 7 on esitetty säilörehuanalyysit vuorokauden kuluttua säilönnästä.

Taulukko 7

Koerehujen analyysitulokset vuorokauden säilönnän jälkeen, Tulokset ovat usean näytteen keskiarvoja.

	<u>Koerehu 1</u>	<u>Koerehu 2</u>
Kuiva-aine (%)	22	22
Sokeri (%)	4,5	5,0
pH	6,0	5,1
Etikka- ja maitohappo (%)	0	0
Glukonihappo (%)	0	1,0

Taulukosta 7 nähdään, että glukoosioksidaasi toimi tehokkaasti myös suolaseoksen yhteydessä pH:ta nopeasti alentaen.

Esimerkki 4

Vastasilputtuun kokoviljaan (ohra) lisättiin 0,005 % glukoosioksidaasivalmistetta tuorepainosta. Glukoosioksidaasivalmiste oli sama kuin esimerkissä 1. Taulukossa 8 on esitetty glukonihapon muodostus ensimmäisen vuorokauden kuluessa.

Taulukko 8

Glukonihapon muodostus kokoviljassa ensimmäisen vuorokauden aikana. Glukoosioksidaasivalmistetta oli lisätty 0,005 % tuorepainosta.

<u>Aika säilönnästä</u>	<u>Puristenesteen glukonihappopitoisuus</u>
2 h	0,71 %
15 h	1,31 %

Taulukosta 8 nähdään, että myös kokoviljan säilönnässä glukoosioksidaasi toimii tehokkaasti glukonihappoa muodostaen ja siten pH:ta laskien ja happea poistaen.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä nurmirehun ja kokoviljan säilömiseksi, t u n -
n e t t u siitä, että silputtuun nurmirehuun tai kokovil-
jaan lisätään niiton tai säilöönpanon yhteydessä 10 000 -
10 000 000 IU glukoosioksidaasia tonnia kohti rehun tuore-
painoa tai kokoviljaa, rehuun tai kokoviljaan sisältyvän
glukoosin muuttamiseksi rehun tai viljan pH:ta säilöntää
varten haluttuun arvoon alentavaksi glukonihapoksi ja hapen
kuluttamiseksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että glukoosioksidaasin mukana lisätään rehuun
tai kokoviljaan sellulaasia, hemisellulaasia tai β -glukosi-
daasia glukoosin tuottamiseksi sinänsä tunnetulla tavalla.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että rehuun tai kokoviljaan lisätään tar-
vittaessa myös katalaasia glukonihapon muodostumisen yhtey-
dessä syntyvän vetyperoksidin muuttamiseksi hapeksi ja ve-
deksi.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että käytetty glukoosioksidaasi sisältää kata-
laasiaktiivisuutta siten, että rehuun tai kokoviljaan lisä-
tään glukoosioksidaasin mukana 500 - 5 000 000 Baker-yksik-
köä katalaasia tonnia kohti rehun tuorepainoa tai kokovil-
jaa.
5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että riittävän alkuhappamuuden ai-
kaansaamiseksi rehuun tai kokoviljaan lisätään sinänsä tun-
nettuja happamuutta lisääviä suoloja, kuten magnesium-,
kalsium- tai ureafosfaattia, kalsium- tai natriumformiaat-
tia tai natriumkloridia ja/tai sinänsä tunnettuja epäorgaa-
nisia tai orgaanisia happoja, kuten rikki-, suola- tai fos-
forihappoa tai muurahais-, etikka-, maito- tai glukonihap-

poa, normalissa AIV-säilönnässä käytettyjä määriä huomattavasti pienemmin määrin.

6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymin tai entsyymien mukana lisätään rehuun tai kokoviljaan sinänsä tunnettu maitohappokäymistä edistävä maitohappobakteeripreparaatti.

7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymin tai entsyymien mukana lisätään rehuun tai kokoviljaan heraa, laktoosin suhteen hydrolysoitua heraa, melassia tai muita sokereita väkevöitynä liuoksena tai kuivattuina.

8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymin tai entsyymien mukana lisätään rehuun tai kokoviljaan sinänsä tunnettuja virhehäymistä estäviä suoloja, kuten formiaattia ja/tai bentsoaattia ja/tai nitriittiä.

Patentkrav

1. Förfarande för ensilering av gräsfoder eller fullsäd, k ä n n e t e c k n a t av att i gräsfoderhackelse eller fullsäd tillsättes i samband med skörden eller ensileringen 10 000 - 10 000 000 IU glukosoxidas per ton färskvikt av fodret eller fullsäden, för omvandling av i fodret eller fullsäden ingående glukos till glukonsyra för sänkande av fodrets eller sädens pH till för ensileringen önskat värde och för förbrukning av syre.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att tillsamman med glukosoxidaset tillsättes i fodret eller fullsäden cellulas, hemicellulas eller β -glukosidas för producerande av glukos på i och för sig känt sätt.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att i fodret eller fullsäden tillsättes vid behov ytterligare katalas för omvandling av vid uppkomsten av glukonsyra bildad väteperoxid till syre och vatten.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t av att det använda glukosoxidaset innehåller katalasaktivitet, så att i fodret eller fullsäden tillsättes tillsammans med glukosoxidaset 500 - 5 000 000 Baker-enheter katalas per ton färskvikt av fodret eller fullsäden.
5. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att för åstadkommande av tillräcklig utgångssurhet i fodret eller fullsäden tillsättes i och för sig kända surheten ökande salter, såsom magnesium-, kalcium- eller ureafosfat, kalcium- eller natriumformiat eller natriumklorid och/eller i och för sig kända oorganiska eller organiska syror, såsom svavel-, salt- eller fosforsyra eller myr-, ättik-, mjölk- eller glukonsyra, i vid normal AIV-ensilering använda mängder avsevärt mindre mängder.
6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att tillsammans med enzymet eller enzymen tillsättes i fodret eller fullsäden ett i och för sig känt mjölksyrajäsning befrämjande mjölksyrabakteriepreparat.
7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att tillsammans med enzymet eller enzymen tillsättes i fodret eller fullsäden vassla, med hänsyn till laktos hydrolyserad vassla, melass eller andra socker i form av en koncentrerad lösning eller i torkad form.

8. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att tillsamman med enzymet eller enzymen tillsättes i fodret eller fullsäden i och för sig kända feljäsning förhindrande salter, såsom formiat och/eller bensoat och/eller nitrit.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 125 038 (A 23 1 3/34).
Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Food Science and Technology Abstracts, vol. 14 (1982) 12 R 813, Food Development 16(1) (1982) p. 36-38.
Food Science and Technology Abstracts, vol. 9 (1977) 7J 1002, Przemysl Fermentacyjny; Rolny 20 (10) (1976) p. 18-19.
Chemical Abstracts, vol. 93 (1980) 166.404e, JP 80 23.071.