P 93/450

/93

68374

ZENECA limited

~~IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC~~, London, Nagy-Britannia

SILÓADALÉK ÉS ELJÁRÁS SILÓZÁSRA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A bejelentés napja: 1991. 08. 27.

Elsőbbsége: 1990. 08. 31. (9019024.0), Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB91/01438

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/05233

Kivonat

A találmány tárgya silóadalék, amely a haszonnövény silózását elősegítő hatóanyagot és cisztein- és/vagy aszparaginsav-proteáz enzim inhibitort tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá eljárás silózásra, amelynek során a haszonnövényt cisztein- és/vagy aszparaginsav-proteáz inhibitorral kezelik.

~~158/907~~

P93 450

7703/93

Képviselő: Dr.Jalsovszky Györgyné Ügyvéd
Társképviselő: Dr.Tóth-Urbán László Ügyvéd

68374

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

N520-: A23K 3/00

A1

158/907

SILÓADALÉK ÉS ELJÁRÁS SILÓZÁSRA

ZENECA Limited of Imperial Chemical House, London

~~IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, London, Nagy-Britannia~~

Feltalálók:
WETHERALL Jane Ann, Rowland Gill, Tyne and Wear,
ROOKE John Andrew, Potterton, Aberdeen,
Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1991. 08. 27.
Elsőbbsége: 1990. 08. 31. (9019024.0) Nagy-Britannia
A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB91/01458
A nemzetközi közzététel száma: WO 92/03933

A találmány silóadalékra vonatkozik. A találmány tárgya továbbá eljárás silózásra.

A silót haszonnövények, például füfélék, gabonamagvak (így kukorica, busa, árpa és cirok), hüvelyesek (így lóhere, lucerna és borsó) és rizs fermentációjával állitják elő. Legegyszerübb formájában a fermentáció természetes uton, a beta-

karitott haszonnövényeken lévő nativ tejsav-termelő baktériumok hatására megy végbe. A fermentáció javitása céljából azonban a haszonnövényhez silózási adalékok (silóadalékok) is adhatók. Ezek az adalékok kémiai adalékok vagy bakteriális adalékok lehetnek; az utóbbiak közé tartoznak a megfelelően megválasztott tejsav-termelő baktériumok. Ilyen silózási adalékok felhasználásával javitható a siló tárolásállósága és stabilitása, csökkenthető a silózási veszteség, és javitható a termék állati takarmányként való hasznosulása. A silózási adalékokat megfelelő berendezés segitségével folyékony szuszpenzió formájában vihetjük fel a betakaritott haszonnövényekre, vagy hatóanyagot és hordozóanyagot tartalmazó szilárd keverék formájában adagolhatjuk be.

A silózás során a növényi fehérjéket a növényi proteázok peptidekké és aminosavakká hidrolizálják, majd ezeket a jelenlévő mikroorganizmusok dezaminálják. Ennek megfelelően a siló a nitrogénvegyületeket elsősorban aminosavak, kis tagszámu peptidek és ammónia formájában tartalmazza, ellentétben a kiindulási növényekkel, amelyek 1 kg teljes nitrogéntartalomra vonatkoztatva körülbelül 750-850 g fehérjében kötött nitrogént tartalmaznak.

A siló nitrogéntartalma a bendő mikrobiális fehérjeszintézise során szubsztrátumként csak csekély mértékben hasznosul. Ezért a silótakarmányt költséges fehérjében dus tápanyagokkal, például szójalisztel vagy hallisztel kell kiegésziteni.

A füfélékben lévő növényi fehérjék silózás közben lezajló hidrolizisének mechanizmusa jelenleg kevéssé ismert. Szükség van azonban a siló tápértékének javitására a silózás során lezajló proteolizis kiküszöbölése vagy csökkentése révén.

A találmány tárgya silóadalék, amely a haszonnövény silózását elősegitő hatóanyagot és cisztein- és/vagy aszparaginsav-proteáz enzim inhibitort tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá eljárás silózásra, amelynek során a haszonnövényt cisztein- és/vagy aszparaginsav-proteáz enzim inhibitorral kezeljük.

A cisztein- és aszparaginsav-proteázok azonositását és jellemzőit Storey és Wagner Phytochemistry, 25 (12) 2701-2709 (1986) közleménye tartalmazza; a szerzők a proteázokat a IUPAC-IUB ajánlásainak megfelelően jellemzik és osztályozzák.

A találmány értelmében a silózáshoz előnyösen cisztein-proteáz enzim inhibitorokat használunk.

A találmány szerinti silóadalék bármilyen ismert, a haszonnövény silózását elősegitő hatóanyagot tartalmazhat. A silózást elősegitő hatóanyag kémiai anyag, például egy sav, igy hangyasav vagy kénsav vagy azok keveréke lehet, silózást elősegitő hatóanyagokként azonban bakteriális eredetü anyagokat is alkalmazhatunk. Bakteriális eredetü hatóanyagokként különösen előnyösen alkalmazhatunk tejsav-termelő Lactobacillus és Streptococcus törzseket, továbbá Pediococcus acidilactici és Pediococcus pentosaceus törzset; ezek közül különösen előnyösek a Lactobacillus plantarum törzsek. Számos anyag silózására kiemelkedően előnyösen alkalmazhatjuk a National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Nagy-Britannia törzsgyüjteményben 1986. november 12-én NCIMB 40027 számon letétbe helyezett, és a Budapesti Szerződés értelmében szabadalmi célu letétként 1988. julius 20-án elfogadott és 1988. julius 25-én meghirdetett Lactobacillus plantarum MTD1 törzset. Előnyösen alkalmazhatjuk továbbá a Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus casei,

Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus brevis, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Streptococcus faecalis, Lactobacillus amylophilus, Streptococcus lactis és Streptococcus thermophilus fajtákhoz tartozó törzseket, elsősorban a Lactobacillus amylophilus NCIMB 11546, a Streptococcus lactis NCIMB 6681 és a Streptococcus thermophilus NCIMB 8510 törzset. Ezek a törzsek a kös számára hozzáférhetők.

A találmány szerinti silóadalékban bármilyen alkalmas cisztein-proteáz inhibitort felhasználhatunk. Általában előnyöseknek bizonyultak a biológiai eredetű inhibitorok, amelyek közül a cisztatinokat, az antipaint és a peptid-epoxidokat, így a transz-epoxi-szukcinil-L-leucil-amido-(4-guanidino)-butánt (E-64) említjük meg. Egy előnyös megoldás szerint a gátló hatás növelése céljából a silózandó haszonnövényt cisztein-proteáz inhibitoron kívül aszparaginsav-proteáz inhibitorral is kezeljük. Aszparaginsav-proteáz inhibitorként például pepsztatin A-t használhatunk.

Az E-64-et Hanada és munkatársai módszerével (Agric. Biol. Chem. 42 /3/, 529-536 /1978/) állíthatjuk elő. A cisztatint Fossum és munkatársai (Arch. Biochem. Biophys. 125, 367 /1968/) ismertették; az anyag további tisztitását és azonositását Sen és munkatársai (Arch. Biochem. and Biophysics 158, 623 /1973/) közlik. Az antipaint Suda és munkatársai (J. Antibiotics 25, 263 /1972/), valamint Umezawa és munkatársai (J. Antibiotics 25, 267 /1972/) ismertetik. A pepsztatint Umezawa és munkatársai (J. Antibiotics 23, 259 /1970/) ismertetik.

A találmány szerinti eljárás során a cisztein-proteáz inhibitort rendszerint a silóadalék egyik komponenseként, a haszonnövény silózását elősegitő hatóanyaggal együtt visszük

fel a haszonnövényre. A cisztein-proteáz inhibitort azonban a silózást elősegitő hatóanyag beadagolása előtt vagy után külön is felvihetjük. Sok esetben előnyös, ha a cisztein-proteáz inhibitort a frissen vágott füfélékre visszük fel silózás előtt. Ha a találmány szerinti eljárásban cisztein- és aszparaginsav--proteáz inhbitort egyaránt használunk, ezt a két anyagot előnyösen egyszerre visszük fel.

1 kg silózandó haszonnövényre előnyösen 10-130 /umól cisztein-proteáz inhibitort viszünk fel. Az inhibitort előnyösen 3 és 7,5 közötti pH-értéken visszük fel a haszonnövényre. Ha a cisztein-proteáz inhibitort aszparaginsav-proteáz inhibitorral együtt alkalmazzuk, a két anyagot célszerüen egyszerre visszük fel; ezek az anyagok azonban tetszés szerinti sorrendben külön--külön is felvihetók. 1 kg haszonnövény kezeléséhez előnyösen 1-60 mg aszparaginsav-proteáz inhibitort használunk. A silózást előnyösen az oxigénforrás korlátozásával vagy az oxigén lényegében teljes kizárásával végezzük.

A találmány szerinti silóadalékot folyadék vagy szemcsés szilárd anyag formájában egyaránt felvihetjük a haszonnövényre. Ha a silóadalékot folyadék formájában visszük fel, hordozóanyagként rendszerint vizet alkalmazunk adott esetben más folyékony hordozóanyaggal, például rövidszénláncu alkohollal, igy propan-1_ollal együtt. A szilárd anyag formájában felviendő silóadalékok szilárd hordozóanyagot tartalmaznak. A szilárd anyag formájában felviendő silóadalékokat rendszerint hordozóanyagot is tartalmazó készitmény formájában hozzuk forgalomba; mig a folyadék formájában felviendő silóadalékokat felhasználás előtt vizben szuszpendálandó anyagkeverék formájában forgalmazzuk.

A szilárd anyag formájában felviendő silóadalékok tetszés szerinti alkalmas szilárd hordozóanyagot tartalmazhatnak. Szilárd hordozóanyagokként például gabonaféléket, így őrölt árpát, őrölt buzát, őrölt kukoricacsutkát, továbbá egyéb szilárd anyagokat, így mészkövet, agyagot, krétát, magnezitet és talkumot alkalmazhatunk.

A szilárd anyag formájában felviendő silóadalékok a hordozóanyagon, a silózást elősegitő hatóanyago(ko)n és a proteáz inhibitoro(ko)n kivül rendszerint egyéb, különféle célokra alkalmas adalékanyagokat is tartalmaznak. Ilyen egyéb adalékanyagok lehetnek például a következők: tápanyagok (például cukrok, így szacharóz vagy laktóz); egyes baktériumok növekedéséhez szükséges növekedési faktorok (így élesztőkivonat, kukoricalekvár, vitaminok és aminosavak); a baktériumok életképességének megőrzése céljából alkalmazott adalékok; antioxidánsok; az oxigénfelvételt elősegitő anyagok; továbbá olajok és az adalékok elporlódását csökkentő vagy tapadását növelő egyéb adalékok.

A silóadalékokban a hordozóanyag és a hatóanyag egymáshoz viszonyitott aránya az adalék tipusától és aktivitásától függően változik.

Ha a találmány szerinti silóadalékot szilárd anyag formájában visszük fel, 1 tonna kezelendő takarmányhoz rendszerint 0,1-5 kg, előnyösen 0,2-1 kg silóadalékot adunk. Ha a találmány szerinti silóadalékot folyékony készitmény formájában visszük fel, 1 tonna kezelendő takarmányhoz célszerüen 0,5-5 liter folyékony készitményt használunk fel, amely 1 liter vizre vonatkoztatva 1-100 g hatóanyagot tartalmaz. A folyékony, illetve szilárd készitmények felviteléhez bármilyen alkalmas

berendezést felhasználhatunk.

A találmány szerinti silóadalékot bármilyen silózható anyag - köztük a korábban felsorolt haszonnövények - silózására felhasználhatjuk. A találmány szerinti silóadalékot különösen előnyösen hasznosithatjuk füfélék silózásához.

A találmányt az oltalmi kör korlátozása nélkül az alábbi példákban részletesen ismertetjük.

1. példa

Perjekivonatokat ammónium-szulfátos kicsapással, gélszűréssel és ioncserés kromatografálással hatvanszorosan tisztitottunk. Tapasztalataink szerint az igy tisztitott kivonatok enzimaktivitása heterogén volt, azonban az enzimaktivitást az 1. táblázatban felsorolt proteáz inhibitorok hasonlóan gátolták. Jelentős gátlást csak p-merkuri-benzoát (cisztein-proteáz inhibitor) felhasználásakor tapasztaltunk. Az enzimaktivitást a pepsztatin (aszparaginsav-proteáz inhibitor) is gátolta, azonban az előzőnél lényegesen kisebb mértékben. Fenil-metil-szulfonil-fluorid (szerin-proteáz inhibitor) felhasználásakor gátlást nem tapasztaltunk. Az észlelt eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a perje fő proteáz komponensként cisztein-proteázokat tartalmaz.

Az eredményeket az 1. táblázatban közöljük. Az 1. táblázatban alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

PCMB: p-merkuri-benzoát

IODAA: jódecetsav

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

1. táblázat

Inhibitor	"Célzott" enzim	Koncentráció	Gátlás, %
PCMB	cisztein	1 mmól	100
IODAA	cisztein	1 mmól	10
PMSF	szerin	1 mmól	2
Pepsztatin	aszparaginsav	5 /ug/ml	17

2. példa

Az 1. példában leirtakat ismételtük meg pufferolt perje-extraktumok felhasználásával. Az extraktumokat különböző pH-értékeken inkubáltuk; az inkubálás alatti fermentáció megakadályozása céljából az elegyhez antibiotikum-keveréket adtunk. Proteáz-inhibitorokként különböző proteázokra specifikus, elsődlegesen mikrobiális eredetü inhibitorokat használtunk. Ebben a kisérletsorozatban az 1. példában vizsgált, félig tisztitott készitményeken észleltéknél kisebb mértékü autolizis-gátló hatást észleltünk, azonban ebben az esetben is csak E-64 (specifikus cisztein-proteáz inhibitor) és pepsztatin alkalmazásakor lépett fel gátló hatás.

Az eredményeket a 2. táblázatban közöljük. A 2. táblázatban alkalmazott rövidités jelentése a következő:

E-64: transz-epoxi-szukcinil-L-leucil-amido-(4-guanidino)-bután

A-PMSF: (p-amidino-fenil)-metil-szulfonil-fluorid

TIU: tripszingátló egység

2. táblázat

Inhibitor	"Célszott" enzim	Koncentráció	pH	Gátlás, %
E-64	cisztein	10 /umól	4	13
pepsztatin	aszparaginsav	5 /ug/ml	5	47
aprotinin	szerin	5,6 TIU	6	0
A-PMSF	szerin	130 /umól	6	0

3. példa

A silózást utszéli perjén (szárazanyagtartalom /SZA/: 279 g/kg; vizben oldható szénhidrát /VOSZ/: 113 g/g SZA; teljes nitrogéntartalom: 26,5 g N/kg SZA; oldható nitrogéntartalom: 433 g/kg N) végeztük. A silózás pH-ja 6,25, illetve 5 volt; az utóbbi esetben a silózást 1,5 g/kg növény mennyiségü hangyasav jelenlétében végeztük. A vizsgált pH-értékeken 6-6 kezelést végeztünk; a kezelések körülményeit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat

Kezelőszer	Koncentráció
Viz	-
E-64	10 /umól
Pepsztatin	5 /ug/ml
E-64 és pepsztatin	mint fent
Burgonyakivonat	higitatlan kivonat
Formalin	3 g/kg növény

Miként a 3. táblázatból látható, négy különböző proteáz-inhibitort használtunk, azaz E-64-et (cisztein-proteáz inhibitor), pepsztatint (aszparaginsav-proteáz inhibitor), vizes

burgonyakivonatot (szerin- és cisztein-proteáz inhibitorokat tartalmaz) és formaldehidet (ez az anyag a fehérjék között reverzibilis keresztkötéseket képezve gátolja a proteolízist). Összesen 36 silózási kísérletet végeztünk; az egyes vizsgálati körülmények között a kísérleteket háromszor ismételtük meg. Silótartályokként Bunsen-szelepekkel felszerelt, 100 ml űrtartalmu mérőhengereket használtunk, amelyekbe 70-70 g silózandó növényt töltöttünk.

A silótartályokat 82 nap elteltével nyitottuk fel. Valamennyi minta jól silózott volt; károsodást szemrevételezéssel nem észleltünk. A silózott minták elemzési adatait a 4. és 5. táblázatban közöljük.

A 4. táblázatban alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

SE: standard hiba (6 vizsgálat átlagértékére vonatkoztatva)

Lac: laktát

Ac: acetát

Et: etanol

SZA: szárazanyag

VOSZ: vízben oldható szénhidrát

4. táblázat

Kezelés	SZA g/kg	pH	VOSZ	Lac g/kg SZA	Ac	Et
Silózás pH 6,2 értéken						
Kontroll	249	3,75	30,1	120	24,3	5,37
E-64	244	3,76	30,6	115	22,7	3,15
Pepsztatin	239	3,75	30,2	126	22,2	9,26
E-64 + pepsztatin	247	3,76	30,1	111	22,5	2,56
Burgonyakivonat	244	3,72	30,0	124	23,1	7,22
Formaldehid	254	3,76	29,6	115	20,8	2,67
Silózás pH 5 értéken						
Kontroll	250	3,69	30,2	124	22,1	0,5
E-64	249	3,72	30,2	115	19,6	0,92
Pepsztatin	251	3,72	29,9	115	21,0	0,5
E-64 + pepsztatin	244	3,80	30,9	102	17,5	2,25
Burgonyakivonat	247	3,74	30,8	110	24,2	13,7
Formaldehid	252	4,49	29,7	51	19,3	18,5
SE	0,5	0,086	0,60	7,0	1,16	1,06

5. táblázat

Kezelés	Összes N g N/kg SZA	Oldható N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
Silózás pH 6,2 értéken			
Kontroll	26,9	535	88,5
E-64	26,3	424	68,3
Pepsztatin	27,1	547	79,6
E-64 + pepsztatin	26,8	454	54,5
Burgonyakivonat	26,2	524	86,9
Formaldehid	24,4	528	85,6

Kezelés	Összes N g N/kg SZA	Oldható N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
Silózás pH 5,0 értéken			
Kontroll	22,1	520	85,3
E-64	27,4	357	58,1
Pepsztatin	25,3	597	75,8
E-64 + pepsztatin	26,5	414	49,6
Burgonyakivonat	27,1	522	68,2
Formaldehid	26,7	518	100,8
SE	0,49	2,4	0,48

A 4. és 5. táblázat adataiból a következő következtetések vonhatók le:

A silózás pH-jának hangyasavas csökkentése csak kismértékben módosította a siló összetételét. A hangyasavas kezelés hatására azonban jelentősen változott a formaldehiddel kezelt siló tejsav-, ecetsav- és etanol-tartalma; a formaldehiddel és hangyasavval egyaránt kezelt siló fermentációs foka alacsony volt. Ennek okát nem ismerjük.

A proteáz-inhibitorok szintén csak kis mértékben befolyásolták a siló fermentációját. A formaldehiddel nem kezelt silóhoz viszonyítva burgonyakivonat hozzáadásakor nem változott a fehérje lebomlása a silóban (lásd az 5. táblázatot). Pepsztatin adagolásakor sem változott a siló minősége. E-64 (cisztein-proteáz inhibitor) hozzáadásakor azonban jelentősen ($p < 0,001$) csökkent a silózás során képződött oldható nitrogén (a kontroll 0,80-szorosa) és az ammónia nitrogén (a kontroll 0,73-szorosa) mennyisége.

A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a silóban lévő fehérje lebontásában elsődlegesen a cisztein-proteázok vesznek részt, és specifikus, mikrobiális eredetű cisztein-proteáz inhibitorok hozzáadásával csökkenthető a silózás során lezajló proteolizis, anélkül azonban, hogy a tejsav-termelődés kedvezőtlenül változna.

4. példa

Utszéli perjét körülbelül 2 cm hosszu szálakra vágtunk, és 20 ml vizzel vagy azonos térfogatu, az alábbiakban ismertetendő összetételü oldatokkal kevertünk össze 70 g apritott növényt. A keveréket összepréseltük, silótartályba helyeztük, a levegő bejutásának megakadályozására a tartályt lezártuk, és a tartályt a kisérlet során szobahőmérsékleten tartottuk. A vizsgált növény szárazanyagtartalma 190 g/kg, vizben oldódó szénhidrát-tartalma 241 g/kg szárazanyag, összes nitrogén tartalma 42,5 g/kg szárazanyag és oldható nitrogén tartalma 487 g/kg nitrogén volt; a fennmaradó nitrogénmennyiséget a növény lényegében fehérje-nitrogénként tartalmazta.

A kezeléshez felhasznált vizes oldatokban lévő enzim-inhibitor és/vagy bakteriális eredetü anyag mennyiségét és minőségét a 6. táblázatban közöljük. A 6. táblázatban megadott mennyiségi adatok a 20 ml oldat formájában 1 g friss növényre felvitt enzim-inhibitor és/vagy bakteriális eredetü anyag mennyiségét jelzik /ug és /umól egységekben.

A 6. táblázatban feltüntetett "Ecosyl" (védjegy) nevü anyag az Imperial Chemical Industries PLC által gyártott, kereskedelmi forgalomban kapható, siló kezeléséhez vizes szuszpenzió formájában felhasználandó silóadalék. Ez az anyag fő komponensként fagyasztva szárított Lactobacillus plantarium NCIMB 48027 törzset tartalmaz tápanyagokkal együtt.

6. táblázat

Kezelés	Koncentráció	
	/ug/g friss növény	/umól/g friss növény
Víz (kontroll)	-	-
E-64	11,25	0,03
E-64	22,5	0,06
E-64	45,0	0,12
Pepsztatin	30,0	0,04
Pepsztatin + E-64	30,0 + 22,5	0,04 + 0,06
Antipain	32,0	0,04
Ciszstatin	1,2	0,9
Ecosyl	3 l/g (2,85 g/l)	
Ecosyl + E-64	a fenti Ecosyl mennyiség + 22,5 /ug/g E-64	

Minden kisérletet háromszor ismételtünk meg. A silótartályokat 50 nap elteltével nyitottuk fel. Valamennyi minta jól silózott volt; károsodást szemrevételezéssel nem észleltünk. A pepsztatin aszparaginsav-proteáz inhibitor; az antipain ciszstein- és szerin-proteáz inhibitor; a ciszstatin ciszstein-proteáz inhibitor. Feltételezésünk szerint mindhárom proteáz inhibitor ekvimolekuláris mennyiségben kapcsolódik a proteázokhoz.

A kapott silómináták elemzési adatait a 7-14. táblázatban közöljük. A táblázatokban megadott nem fehérje-nitrogén (oldható nitrogén) mennyisége nem tartalmazza az ammónia nitrogént. A táblázatokban megadott rövidítések és betűjelzések jelentése a következő:

SE: standard hiba (három vizsgálat átlagértékére vonatkoztatva),

La: laktát (szabad savként kifejezve),

Ac: acetát (szabad savként kifejezve),

Eth: etanol,

SZA: szárazanyag;

VOSZ: vizben oldható szénhidrát

A silózott termékek vizsgálata azt mutatta, hogy a proteáz inhibitorok csak csekély hatást gyakorolnak a siló fermentációjára, és a tejsav-termelődés nem változik.

7. táblázat

Növekvő mennyiségü E-64 hatása a siló nitrogéntartalmu frakcióinak mennyiségére

E-64 koncentrációja /ug/g növény	Összes N g N/kg SZA	Nem fehérje N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
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

A 11,25 /ug/g E-64-gyel kezelt silóban az oldható nitrogén (nem fehérje nitrogén) mennyisége a kontroll érték 87 %-ára csökkent. A 45,0 /ug/g E-64-gyel kezelt silóban az oldható nitrogén mennyisége a kontroll érték 75 %-ára, mig az ammónia nitrogén mennyisége a kontroll érték 70 %-ára csökkent.

8. táblázat

Növekvő mennyiségű E-64 hatása a siló összetételére

E-64 koncentrációja /ug/g növény	A siló pH-ja	SZA g/kg növény	VOSZ	La g/kg SZA	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

A "szárazanyag" megjelölésen a növény vagy a siló szárítása után kapott maradék mennyiségét értjük.

9. táblázat

E-64 és pepsztatin hatása a siló összetételére

Kezelés	Összes N g N/kg SZA	Nem fehérje N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
Kontroll	407	643	72,4
E-64; 22,5 /ug/g növény	366	556	70,8
Pepsztatin; 30 /ug/g növény	435	521	60,6
E-64 + pepsztatin 22,5 + 30 /ug/g növény	428	438	62,9
SE	1,51	0,63	0,54

A pepsztatinos kezelés hatására a siló oldható nitrogén (nem fehérje nitrogén) tartalma a kontroll érték 81 %-ára csökkent. Pepsztatin és E-64 együttes alkalmazásakor az oldható nitrogén mennyisége nagyobb mértékben (a kontroll érték 68 %-ára) csökkent, mint ha a két inhibitort külön-külön alkalmaznánk.

10. táblázat

E-64 és pepsztatin hatása a siló összetételére

Kezelés	A siló pH-ja	SZA g/kg növény	VOSZ	La g/kg SZA	Ac	Eth
Kontroll	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
22,5 /ug E-64/ g növény	3,48	163	24,2	188	22,2	33,3
30 /ug pepsztatin/g növény	3,61	164	17,5	168	16,1	36,0
22,5 /ug E-64 + 30 /ug pepsztatin/g növény	3,56	163	11,1	171	23,9	38,9
SE	0,02	0,12	0,66	8,48	5,39	8,68

11. táblázat

Cisztein-proteáz inhibitorok hatása a siló nitrogéntartalmu frakcióinak mennyiségére

Kezelés	Összes N g N/kg SZA	Nem fehérje N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
Kontroll	407	643	72,4
22,5 /ug E-64/g növény	366	556	70,8
1,2 /ug cisztatin/g növény	406	571	75,7
32 /ug antipain/g növény	411	524	69,1
SE	1,02	2,40	0,76

A cisztatinos kezelés hatására a siló oldható nitrogén tartalma a kontroll érték 88 %-ára, míg az antipainos kezelés hatására a siló oldható nitrogén tartalma a kontroll érték 81 %-ára csökkent.

12. táblázat

Cisztein-proteáz inhibitorok hatása a siló összetételére

Kezelés	A siló pH-ja	SZA g/kg növény	VOSZ	La g/kg SZA	Ac	Eth
Kontroll	3,48	156	20,5	184	22,5	10,0
22,5 /ug E-64/g növény	3,48	163	24,2	190	22,2	33,3
32 /ug antipain/ g növény	3,55	161	24,1	163	28,8	4,31
1,2 /ug ciszta-tin/g növény	3,65	160	17,2	183	29,4	4,55
SE	0,03	3,09	0,93	19,2	8,57	5,07

13. táblázat

E-64 és Ecosyl hatása a siló nitrogéntartalmu frakcióinak mennyiségére

Kezelés	Összes N g N/kg SZA	Nem fehérje N g N/kg N	Ammónia N g N/kg N
Kontroll	407	643	72,4
22,5 /ug E-64/g növény	366	586	70,8
8,55 /ug Ecosyl/g növény	378	533	63,2
22,5 /ug E-64 + 8,55 /ug Ecosyl/g növény	355	421	53,3
SE	0,79	1,51	0,79

Ecosyl-lel végzett kezelés hatására a siló oldható nitrogén tartalma a kontroll 82 %-ára csökkent. E-64-gyel és Ecosyl-lel együttesen végzett kezelés hatására a siló oldható nitrogén tartalma nagyobb mértékben (a kontroll 65 %-ára) csökkent

annál, mint ha a két anyagot külön-külön alkalmaznánk.

14. táblázat

E-64 és Ecosyl hatása a siló összetételére

Kezelés	A siló pH-ja	SZA g/kg növény	VOSZ	La g/kg SZA	Ac	Eth
Kontroll	3,48	156	20,6	184	22,5	16,0
22,5 /ug E-64/g növény	3,48	163	24,1	188	22,2	33,0
8,55 /ug Ecosyl/ g növény	3,63	154	16,0	149	42,6	11,2
8,55 /ug Ecosyl + 22,5 /ug E-64/g növény	3,45	164	28,9	132	42,0	30,2
SE	0,03	0,11	0,92	13,9	8,53	5,45

A 7-14. táblázatban feltüntetett adatokból az alábbi következtetések vonhatók le:

Silózás során a cisztein- és aszparaginsav-proteázok proteolitikus hatást fejtenek ki. Specifikus, biológiai eredetű cisztein- és aszparaginsav-proteáz inhibitorok hozzáadásával csökkenthető a silózáskor lezajló proteolizis mértéke, anélkül azonban, hogy az adalékanyag károsan befolyásolná a silózáskor képződő tejsav mennyiségét.

Az Ecosyl-lal kezelt silóban a kontrollhoz viszonyítva csökken az oldható nitrogén mennyisége, ami a perjében lévő proteolitikus enzimek (amelyek optimálisan az 5 és 7 közötti pH-tartományban működnek) működésére a pH-változás által gyakorolt hatással magyarázható. Az Ecosyl-lal kezelt siló esetén a silózás kezdeti szakaszában a pH gyorsabban csökken, mint a kontroll mintában.

Ha a silózás során az acosyl-t cisztein- és aszparaginsav-proteáz inhibitorokkal vagy cisztein-proteáz inhibitorral együtt alkalmazzuk, nagyobb mértékben csökken a proteolizis, mint ha ezeket a komponenseket külön-külön alkalmaznánk.

Szabadalmi igénypontok

1. Silóadalék, azzal j e l l e m e z v e, hogy a haszonnövény silózását elősegitő hatóanyagot és ciszteinés/vagy aszparaginsav-proteáz enzim inhibitort tartalmaz.

2. Eljárás silózásra, azzal j e l l e m e z v e, hogy a silózandó haszonnövényt ciszteín- és/vagy aszparaginsav--proteáz enzim inhibitorral kezeljük.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a silózást elősegitő hatóanyag egy sav vagy egy bakteriális eredetü hatóanyag.

4. A 3. igénypont szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a bakteriális eredetü hatóanyag egy tejsav-termelő Lactobacillus és/vagy Streptococcus és/vagy Pediococcus törzs.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az inhibitor cisztatin, antipain vagy egy peptid-epoxid.

6. Az 5. igénypont szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a peptid-epoxid transz-epoxi--szukcinil-L-leucil-amido-(4-guanidino)-bután.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az inhibitor egy cisztein-proteáz enzim inhibitor.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti silóadalék vagy eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy ciszteinés aszparaginsav-proteáz enzim inhibitor együttesen van jelen.

9. A 2-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a cisztein-proteáz inhibitort silózás előtt visszük fel frissen vágott füfélékre.

10. A 2-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a cisztein-proteáz inhibitort 10-130 /umól/kg haszonnövény mennyiségben visszük fel a silózandó haszonnövényre.

11. A 2-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az aszparaginsav-proteáz inhibitort 1-60 mg/kg haszonnövény mennyiségben visszük fel a silózandó haszonnövényre.

12. A 2-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az inhibitort 3 és 7,5 közötti pH-értéken visszük fel a silózandó haszonnövényre.

13. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti silóadalék, azzal j e l l e m e z v e, hogy cisztein- vagy aszparaginsav-proteáz inhibitort tartalmaz viztartalmu folyékony hordozóanyaggal együtt.

14. A 2-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy 1 tonna kezelendő takarmányra 0,5-5 liter folyékony silóadalékot viszünk fel, amely literenként 1-100 g proteáz-inhibitort tartalmaz viztartalmu folyékony hordozóközegben.

15. A 2-12. és 14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a silót füfélék, gabonamagvak, hüvelyesek vagy rizs fermentálásával alakitjuk ki.

16. Az 1. igénypont szerinti silóadalék, azzal j e l l e m e z v e, hogy az lényegében a példákban leirtaknak felel meg.

17. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy lényegében a példákban közöltek szerint járunk el.

18. A 2-12., 14. és 15. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállitott siló.

A bejelentő helyett
a meghatalmazott:

23 lap
9 ábrával

23