



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: A 23 K

3/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

633 944

②① Gesuchsnummer:	1681/78	⑦③ Inhaber:	AB Medipharma, Angelholm (SE)
②② Anmeldungsdatum:	15.02.1978		
③① Priorität(en):	16.02.1977 SE 7701687	⑦② Erfinder:	Endre Kvanta, Angelholm (SE)
②④ Patent erteilt:	14.01.1983		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	14.01.1983	⑦④ Vertreter:	A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

⑤④ Verfahren zur Fermentierung von Grünfütter.

⑤⑦ Verfahren zur Fermentierung von Grünfütter in einem Fermentierungsbehälter, insbesondere einem Silo, worin das Grünfütter zu einem Pressfütter zusammengepresst wird, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Grünfütter eine Kultur eines Milchsäure erzeugenden Bakterienorganismus, der zur Gattung Streptococcus gehört, zusetzt und die Fermentierung in Gegenwart einer Stickstoffquelle, einer Quelle von abbaubaren Kohlehydraten und von lebensnotwendigen Wachstumsfaktoren bei einer Temperatur von mindestens 15°C und im übrigen unter solchen Bedingungen, dass der endgültige Milchsäuregehalt des Pressfütters mindestens 2 % beträgt, ausführt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Fermentierung von Grünfütter in einem Fermentierungsbehälter, insbesondere einem Silo, worin das Grünfütter zu einem Pressfütter zusammengepresst wird, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Grünfütter eine Kultur eines Milchsäure erzeugenden Bakterienorganismus, der zur Gattung *Streptococcus* gehört, zusetzt und die Fermentierung in Gegenwart einer Stickstoffquelle, einer Quelle von abbaubaren Kohlehydraten und von lebensnotwendigen Wachstumsfaktoren bei einer Temperatur von mindestens 15 °C und im übrigen unter solchen Bedingungen, dass der endgültige Milchsäuregehalt des Pressfütters mindestens 2% beträgt, ausführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fermentierung ausführt, bis ein pH-Wert von 3,5 bis 4,0 erreicht ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die dem Grünfütter zugesetzte Kultur eine Halbwertszeit von höchstens 30 Minuten hat und homofermentativ ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Grünfütter eine Suspension einer Kultur von *Streptococcus faecium* zusetzt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Grünfütter eine solche Menge der Kultur zusetzt, dass eine Anfangskonzentration von mindestens 15 000 lebenden Zellen pro g Futter erhalten wird.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Pressfütter durch gesteuerte Milchsäuregärung, insbesondere auf ein Verfahren zur Fermentierung von Grünfütter in einem Silo oder dergleichen, um das Futter zu konservieren. Der Ausdruck «Grünfütter» bedeutet grüne Pflanzen oder Pflanzenteile, wie das Kraut von Knollenfrüchten, der zweite Schnitt oder Weidegras, und «Pressfütter» bedeutet derartiges Grünfütter, das in einem Silo oder dergleichen, gewöhnlich durch sein eigenes Gewicht, zusammengepresst worden ist.

Es ist bekannt, dass die Konservierung von Grünfütter durch Säuerung erfolgen kann. Die Säuerung kann entweder durch sogenannte Selbstgärung oder durch Zusatz einer geeigneten Säure erfolgen. Das säurekonservierte Grünfütter kann für die Fütterung, insbesondere von Rindern, verwendet werden.

Es ist auch bekannt, dass die Säuerung im Prinzip nach zwei verschiedenen Verfahren erfolgen kann. Bei einem dieser Verfahren wird das Grünfütter in Silos oder dergleichen gesammelt, wo Selbstgärung unter Bildung von u. a. Milchsäure erfolgen kann. Bei der Selbstgärung werden auch oft unerwünschte Abbauprodukte, wie Buttersäure, gebildet. Diese unerwünschten Nebenprodukte verschlechtern die Qualität des Pressfütters in hohem Grad. Ein anderer Nachteil der Selbstgärung ist die Tatsache, dass der Proteinwert des Pressfütters oft abnimmt, im allgemeinen um bis zu 70%. Diese Nachteile führen zu grossen Verlusten bei der Tier- und Milchproduktion. Die Selbstgärungsmethode ist im allgemeinen sehr unsicher und führt oft zu einer totalen Fäulnis des Grünfütters, insbesondere infolge von Temperatureinflüssen. Diese Methode wird jetzt sehr selten angewendet.

Die üblichste Methode für die Herstellung von Pressfütter besteht darin, dass das Grünfütter in Silos oder derglei-

chen gesammelt und dem Grünfütter geeignete Säuren, wie z. B. Salzsäure oder eine Mischung von verschiedenen Säuren, zugesetzt werden. Ausser Mineralsäuren können auch organische Säuren, wie Ameisensäure und Propionsäure, verwendet werden. Der pH-Wert des so behandelten Grünfütters ist so niedrig, dass sich keine Fäulnisbakterien entwickeln können. Gleichzeitig ist es möglich, die Ernährungseigenschaften des Futters vollständig zu erhalten. Vor der Verwendung des so gesäuerten Grünfütters – das sogenannte Sauerfütter – werden die Säure oder die Säuren oft mit einer geeigneten Base, z. B. Kalk, neutralisiert. Der Nachteil einer Behandlung dieses Typs besteht darin, dass mit bedeutenden Kosten Stoffe mit geringem oder keinem Nährwert zugeführt werden, was vom Typ der verwendeten Säure abhängt. Die Handhabung von korrodierenden Säuren bringt ausserdem bedeutende Unannehmlichkeiten mit sich und erfordert spezielle Installationen.

Erfindungsgemäss werden die oben genannten Nachteile durch eine gesteuerte Milchsäuregärung beseitigt.

Die Erfindung bezieht sich somit auf ein Verfahren zur Fermentierung von Grünfütter in einem Silo oder dergleichen, wobei das Grünfütter zu einem Pressfütter zusammengepresst wird, und ist durch die Merkmale des Anspruches 1 gekennzeichnet.

Bei der industriellen Herstellung von Milchsäure, sowohl von reiner Milchsäure als auch von verschiedenen Molkerei-erzeugnissen und anderen gegorenen Lebensmitteln, werden oft Organismen verwendet, die zur Familie *Lactobacillaceae* gehören. In diesem Zusammenhang werden meistens verschiedene Typen von *Lactobacillus* und Arten von *Streptococcus*, die zur sogenannten Milchsäuregruppe gehören, verwendet.

Erfindungsgemäss werden für die Erzeugung von Milchsäure Organismen verwendet, die zur Gruppe *Enterococcus* gehören, und zwar insbesondere *Streptococcus faecium*. Das Handbuch *Bergey's Manual* von 1957 bezeichnet *Streptococcus faecium* nicht als einen unabhängigen Stamm. Spätere Literaturangaben (Whittenbury, Deibel et al, 1964) teilen die Gruppe D-*Streptococcus*, die sogenannten *Enterococcus*, so ein, dass *Streptococcus faecium* als ein unabhängiger Stamm angesehen wird. Weiter wird angegeben, dass der Typ aus einer Anzahl von Stämmen besteht, die sich voneinander hinsichtlich einfacher biochemischer und immunologischer Eigenschaften unterscheiden. Vereinfachend bedeutet dies, dass *Streptococcus faecium* eine Mittelgruppe zwischen *Streptococcus durans* und *Streptococcus faecalis* ist. Vor allem sind die Unterschiede von *Streptococcus faecalis* wichtig: Stämme von *Streptococcus faecium* benötigen Folsäure als lebensnotwendigen Wachstumsfaktor, was bei *Streptococcus faecalis* nicht der Fall ist.

Stämme von *Streptococcus faecium* wurden aus der Darmflora von Menschen, Schweinen, Rindern, Schafen und Hühnern isoliert. *Streptococcus faecium* gehört zu der natürlichen Darmflora dieser Organismen.

Streptococcus faecium ist homofermentativ, d. h. er erzeugt beim Abbau von verwertbaren Kohlehydraten nur Milchsäure. Typen, die keine löslichen Hämolyse erzeugen, werden als vollständig apathogen angesehen, und die Toleranz von höheren Organismen gegen hohe Prozentsätze von *Streptococcus faecium* ist sehr gut. Bei peroraler Verabreichung von *Streptococcus faecium* sind keine ernstesten negativen Wirkungen bekannt geworden.

Streptococcus faecium vermag die meisten Mono- und Disaccharide als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Dabei entstehen aus 1 Mol Monosaccharid (= Glucose) 2 Mole Milchsäure. Der endgültige pH-Wert in nichtgepufferten Kulturen liegt zwischen 3,6 und 4,0.

Bei der Behandlung von Grünfütter zwecks fermentativer Herstellung von Sauerfütter wäre die geeignetste Methode zur Lenkung des Prozesses die Verwendung von Typen, die zu *Lactobacillus* gehören. Es ist bekannt, dass verschiedene Typen von *Lactobacillus* für die Stabilisierung der Darmflora von Haustieren verwendet werden können. Es wäre demzufolge naheliegend, für die Erzeugung von Milchsäure im Grünfütter *Lactobacillus* zu verwenden und dadurch gleichzeitig mehrere Vorteile zu erzielen, nämlich einerseits die Konservierung des Futters und andererseits die Verabreichung von *Lactobacillus* mit dem Silofütter an die Tiere. Eine solche Verabreichung von verschiedenen sogenannten lactogenen Organismen (*Lactobacillus* und *Streptococcus*) zu präventiven oder therapeutischen Zwecken wird allgemein Lactobacillustherapie genannt.

Es ist bekannt, dass Organismen, die bei der Lactobacillustherapie verwendet werden, durch Erzeugung von Milchsäure das Wachstum von Mikroorganismen, die man allgemein proteolytisch nennt, zu verhindern oder verringern vermögen. Solche Organismen sind für die Fäulnis in der Natur verantwortlich, während andere pathogen sind, wenn man sie im Darmkanal wachsen lässt.

In gleicher Weise, wie die Zusammensetzung der Darmflora durch eine Förderung des Wachstums von lactogenen Bakterien beeinflusst werden kann (Bullen, Willis 1971), vermag das Wachstum solcher Organismen z. B. bei der Behandlung von Pressfütter das Wachstum und den Stoffwechsel von proteolytischen Organismen zu verhindern bzw. zu bremsen. Die wichtigste Ursache für die antagonistische Wirkung scheint die Fähigkeit lactogener Organismen zur Erzeugung von Milchsäure zu sein. Ein Beispiel für die selektive Rolle des Milchsäuremilieus ist die Tatsache, dass in einer Darmflora, die von *Lactobacillus* dominiert ist, ein durchschnittlicher pH-Wert von 5,1 gemessen wurde, während der pH-Wert in einer sogenannten colidominierten Darmflora 6,5 betrug. Gleichzeitig vermochten coliforme Bakterien und *Enterococcus* zu wachsen, während im ersten Falle nur *Lactobacillus* zu wachsen vermag. In der sogenannten colidominierten Darmflora wurden auch Typen von *Chlostridium*, *Bacteroides*, *Proteus* und *Pseudomonas* gefunden. Mehrere dieser Typen sind sogenannte proteolytische und pathogene Typen. Die Verhältnisse sind in den meisten biologischen Materialien mit einer spontanen unkontrollierten Gärung ähnlich.

Eine Möglichkeit zur Verhinderung der unkontrollierten Gärung von Pressfütter wäre der Zusatz einer relevanten Menge eines geeigneten Stammes von *Lactobacillus*, wobei auch die spezifischen Anforderungen an die Nährstoffzufuhr und die Temperatur zur Erzielung einer schnellen Milchsäureerzeugung erfüllt werden sollten. Praktische Versuche haben indessen gezeigt, dass eine genügend hohe Milchsäureproduktion mit gerechtfertigten Mengen eines Typs von *Lactobacillus*, z. B. *Lactobacillus acidophilus*, schwer zu erreichen ist. Der Grund dafür scheint die lange Entwicklungszeit des *Lactobacillus*, d. h. die langsame Wachstumsge-
schwindigkeit, zu sein.

Es wurde bereits erwähnt, dass die Milchsäurekonzentration in einem gegorenen Produkt von entscheidender Bedeutung für die Konservierung ist. Folglich gibt es bei lactogenen Organismen einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, die Konservierung zu bewirken, und der Fähigkeit, Milchsäure zu erzeugen. In dieser Hinsicht scheint es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen lactogenen Organismen zu geben. Es hat sich als notwendig erwiesen, dass die Milchsäurekonzentration einen gewissen Schwellenwert erreicht, um das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu verhindern. Daraus folgt, dass das Resultat bei der Behandlung von Pressfütter mit

Milchsäure erzeugenden Bakterien in sehr hohem Grad davon abhängt, wie schnell dieser Schwellenwert erreicht wird. Bei einem zu langsamen Wachstum und damit einer zu langsamen Milchsäureproduktion kann die Fäulnis infolge des Wachstums von proteolytischen Mikroorganismen einen solchen Umfang annehmen, dass das Resultat selbst dann unbefriedigend ist, wenn das weitere Wachstum dieser Organismen allmählich gestoppt wird.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird eine Kultur eines Milchsäure erzeugenden Bakterienorganismus verwendet, der zur Gattung *Streptococcus* gehört, eine Halbwertszeit von höchstens 30 Minuten hat und homofermentativ ist. Dadurch erhält man u. a. den Vorteil, dass der oben genannte Schwellenwert schnell erreicht werden kann und dass ausserdem nur Milchsäure erzeugt wird.

Es wurde im Zusammenhang mit der Erfindung festgestellt, dass der Typ *Streptococcus faecium* sich besonders für eine schnelle Milchsäureproduktion eignet und dadurch der Schwellenwert der Milchsäurekonzentration bei der Behandlung von Grünfütter zwecks Herstellung von Pressfütter (Silofütter) schnell erreicht werden kann.

Ausser der Fähigkeit, Milchsäure zu erzeugen und damit eine bakteriostatische Wirkung infolge pH-Senkung auszuüben, scheint *Streptococcus faecium* auch lösliche Stoffwechselprodukte, die direkt oder indirekt eine bakteriostatische/bakterizide Wirkung haben, zu erzeugen vermögen.

Bei Untersuchungen wurde gefunden, dass zellfreies Medium aus *Str. faecium*-Kulturen eine starke Aktivität gegen *E. coli* (bakteriostatische Wirkung) hat. Es wurde weiter gefunden, dass mehrere andere Stämme von lactogenem *Streptococcus* und *Lactobacillus*, die quantitativ vergleichbare Mengen Milchsäure produzieren, keine Aktivität gegen *E. coli* im zellfreien Medium aufweisen. Die Erklärung der bakteriostatischen Wirkung des zellfreien Mediums könnte entweder sein, dass das Medium eine bakteriostatische/bakterizide Substanz, wie 2-Desoxy-D-glucose, enthält oder dass *Streptococcus faecium* eine Substanz erzeugt, die als Aktivator des sogenannten Lactoperoxidase-Systems fungiert, z. B. Wasserstoffperoxid.

Dieses Prinzip beruht darauf, dass das Wasserstoffperoxid, das in kleinen Mengen von mehreren Bakterientypen erzeugt wird, Lactoperoxidase aktiviert, die in den meisten biologischen Materialien enthalten ist. Lactoperoxidase führt ihrerseits SCN-Ionen, die gewöhnlich in biologischen Materialien vorhanden sind, in ein Zwischenprodukt über, das stark bakterizid wirkt.

Gleichgültig, welches bakteriologische Prinzip auf das zellfreie Medium aus *Str. faecium*-Kulturen anwendbar ist, kann man sagen, dass die Konservierungswirkung bei der Behandlung von Pressfütter mit einer Kultur von *Str. faecium* zum Teil durch eine schnelle Produktion von Milchsäure und zum Teil durch die direkte oder indirekte bakteriostatische Wirkung eines Stoffwechselproduktes, das *Str. faecium* erzeugt, erreicht wird.

Für eine Beschreibung von *Str. faecium* wird auf die folgende Literatur verwiesen:

Barnes, M. E., «Journal of Applied Bacteriology», Bd. 27 (3), 1964, 461 und Whittenbury, R.: «The Journal of General Microbiology» 38 (1965), 279.

Die Bedingungen für das Wachstum von *Str. faecium* in Grünfütter und damit für eine relevante Produktion von Milchsäure sind:

1. Zufuhr von lebensnotwendigen Wachstumsfaktoren, wie Vitamine und Mikroelemente, und einer geeigneten Stickstoffquelle

2. Durch Gärung abbaubare Kohlehydrate
3. Geeignete Temperatur
4. Geeignete Feuchtigkeit

Bei der Behandlung wird dem Grünfutter eine Kultur von *Str. faecium* in einer solchen Menge zugesetzt, dass sich eine Anfangskonzentration der Bakterien von mindestens ca. 15 000 lebenden Zellen pro g Futter ergibt. Die Bakterien produzieren Milchsäure unter Verwertung der verfügbaren und abbaubaren Kohlehydrate im Zellsaft. Das Verhältnis von Kohlehydraten zu erzeugter Milchsäure ist theoretisch 1:1, d. h. aus 1 g Kohlehydrat kann 1 g Milchsäure erzeugt werden. Praktisch ist das Verhältnis ungefähr 1:0,8, d. h. eine Ausbeute an Milchsäure, die ca. 20% niedriger als der theoretische Wert ist.

Der Gehalt an lebensnotwendigen Nährstoffen genügen im allgemeinen für ein relevantes Wachstum von Milchsäure erzeugenden Bakterien. Diese sind hauptsächlich Mineralstoffe und stickstoffhaltige Verbindungen, die als Stickstoffquelle verwertet werden können. Diese Stoffe können im Zellsaft gefunden werden, ebenso einige Vitamine, die auch notwendig für das Wachstum sind. Die Voraussetzung für die Verwertung dieser Stoffe ist indessen, dass die im Zellsaft gelösten Stoffe ausgepresst werden, so dass ein flüssiges Medium erhalten wird.

Um eine annehmbare Konservierungswirkung zu erreichen, muss der endgültige Milchsäuregehalt in dem Pressfutter mindestens 2% sein. Der pH-Wert für Silofutter, das ca. 2,5% Milchsäure enthält, beträgt ca. 3,5 bis 4,0. Diese Acidität genügt gewöhnlich, um unerwünschte Arten der Bakteriengärung zu verhindern. Der Gesamtgehalt an abbaubaren Zuckern sollte dem zufolge mindestens 2,5% sein. Im allgemeinen ist diese Forderung gut erfüllt.

Die Fermentierung setzt voraus, dass das Pressfutter auf einer geeigneten Temperatur, d. h. mindestens 15 °C und nicht über 38 °C, gehalten wird. Da die Milchsäureproduktion bei der Fermentierung mit *Str. faecium* ein exothermer Prozess ist, ist die Aufrechterhaltung einer geeigneten Fer-

mentierungstemperatur in der Regel kein Problem. Erfahrungsgemäss fördert eine höhere Fermentierungstemperatur bei der Fermentierung mit z. B. *Lactobacillus* auch das Wachstum von proteolytischen Organismen, da die Milchsäureproduktion ein langsamer Prozess ist. Bei der Fermentierung mit *Str. faecium* erfolgt die Milchsäureproduktion sehr schnell. Zwar steigt die Temperatur in dem Pressfutter schneller als im ersteren Fall, aber dies bringt keine Unannehmlichkeiten mit sich, da sich gleichzeitig Milchsäure in solchen Mengen bildet, dass eine unerwünschte Gärung wirksam gehemmt wird. Bei Temperaturen über 30 °C ist der Fermentierungsprozess nach 5 bis 8 Stunden beendet.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird im folgenden Beispiel erläutert:

Beispiel

100 kg Grünfutter (Rübenkraut od. dgl.) werden mit einer Bakteriensuspension besprüht, deren Volumen je nach dem Wassergehalt des Futters 5 bis 15 Liter beträgt. Die Suspension wird durch Auflösen eines Präparates, das aus einer gefriergetrockneten Kultur von *Str. faecium*, Kohlehydraten, Vitaminen, Riboflavin, Ca-Panthotenat, Folsäure, Niacin und Molkepulver besteht, hergestellt.

Die Menge der lebenden Zellen von *Str. faecium* in der Bakteriensuspension wird so eingestellt, dass sich ein Gehalt auf ca. 20×10^3 Zellen pro g Pressfutter ergibt. Danach wird das Futter einem Druck ausgesetzt, um den Zellsaft herauszupressen. Die Temperatur soll mindestens 15 °C, zweckmässig mindestens 18 °C, betragen. Unter diesen Bedingungen ist die Fermentierung nach 3 bis 8 Tagen beendet, und die Milchsäurekonzentration hat gleichzeitig ihren Höchstwert erreicht.

Obwohl das erfindungsgemässe Verfahren anhand von *Str. faecium* erläutert wurde, ist es für den Fachmann klar, dass jeder andere Milchsäure erzeugende Bakterienorganismus, der zur Gattung *Streptococcus* gehört, mit demselben zufriedenstellenden Resultat verwendet werden kann.