ROMANIA

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

(11) Nr. brevet: **110194 B1**
(51) Int.Cl.[6] A 23 K 3/00

(12) # BREVET DE INVENŢIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenţie poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **93-00266**

(22) Data de depozit: **27.08.91**

(30) Prioritate: 31.08.90 GB 9019024.0

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.11.95 BOPI nr. 11/95

(45) Data eliberării şi publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecţionare la brevet:
Nr. &

(62) Divizată din cererea:
Nr. &

(86) Cerere internaţională PCT:
Nr. GB 91/01438 27.08.91

(87) Publicare internaţională:
Nr. WO 92/03933 19.03.92

(56) Documente din stadiul tehnicii:
DE 701217
*Canadian Journal of Plant Science*, vol.61, no.1, 1981 (CA) B.D. McKersie, *Proteinaze şi peptidaze la lucernă*

(71) Solicitant: Imperial Chemical Industries PLC, Londra, GB

(73) Titular: Zeneca Limited, Londra, GB

(72) Inventatori: Wetherall Jane Ann, Rooke John Andrew, GB

## (54) Aditiv pentru furaj şi procedeu pentru prepararea unui furaj conţinând acest aditiv

(57) **Rezumat:** Invenţia se referă la un aditiv pentru furaj, constituit dintr-un ingredient activ, pentru însilozare, eventual alături de alţi ingredienţi în sine cunoscuţi şi dintr-un inhibitor de enzimă protează, selectat dintre inhibitori de protează cisteinică şi inhibitori de protează aspartică sau amestecul lor, inhibitorul fiind de origine biologică şi la un procedeu pentru prepararea unui furaj conţinând aditivul în care, fie plante erbacee, grăunţe de cereale, leguminoase sau orez se însilozează împreună cu ingredientul activ de însilozare, în prezenţa inhibitorului de protează, ales dintre inhibitorii de protează cisteinică şi inhibitorii de protează aspartică, fie inhibitorul de protează cisteinică este aplicat pe iarba proaspăt cosită, înainte de însilozare.

Revendicări: 12

RO 110194 B1

Invenţia de faţă se referă la un aditiv pentru furaj şi la un procedeu pentru prepararea furajului care conţine acest aditiv.

Furajul este produs prin fermentarea culturilor, cum ar fi plante ierbacee, grăunţe de cereale, de exemplu, porumb, grâu, orz şi sorg; leguminoase, de exemplu, trifoiuri, mazăre şi lucernă şi orez. În cea mai simplă formă a sa fermentarea este o fermentare naturală realizată de către bacteriile native producătoare de acid lactic prezente în cultură, când aceasta este recoltată. Fermentaţia poate totuşi să fie îmbunătăţită prin adăugarea de aditivi de furaj, care pot fi chimici sau bacterieni, adică conţinând bacterii selectate, producătoare de acid lactic în cultură. Utilizarea unor astfel de aditivi de furaj duce la o conservare îmbunătăţită şi la o stabilitate crescută, a produsului de furajare cu pierderi reduse, pe timpul însilozării şi performanţe îmbunătăţite ale animalelor alimentate cu acest produs. Aditivii de furaj pot fi aplicaţi culturile recoltate, fie sub formă de suspensii lichide, utilizând instrumente adecvate, fie sub formă de compoziţii solide conţinând un ingredient activ amestecat cu purtători.

Pe timpul însilozării, proteinele din plante sunt, în cea mai mare parte, hidrolizate, la peptide şi aminoacizi de către protează din plante şi ulterior sunt determinate prin activitate microbiană. Constituentele conţinând azot ale furajului sunt prin urmare în mod predominant aminoacizi, peptide scurte şi amoniac, în contrast cu ierburile de păşune care conţin aproximativ 750÷850 g azot proteinic real/kg de azot total.

Azotul din furajele pentru rumegătoare este slab utilizat ca substrat pentru sinteza microbiană de proteină. Prin urmare, este necesar ca alimentaţia cu furaj să fie suplimentară cu materiale alimentare bogate în proteine, care sunt costisitoare, cum ar fi făină de soia şi făină de peşte.

Până în prezent, se cunoaşte puţin despre mecanismul prin care proteinele din plante sunt hidrolizate pe timpul însilozării ierburilor.

Astfel, pentru menţinerea valorilor nutritive, din furajele verzi, pe timpul însilozării, se cunoaşte din brevetul german DE 701217, un aditiv de însilozare care constă din preparate îmbogăţite în enzime, ce



descompun hidraţii de carbon. Astfel de enzime sunt diastazele, celulazele, hemicelulazele sau pectilazele.

În *Canadian Journal of Plant Science*,vol.61, no.1, 1981 (CA), B.D. Mc Kersie *Proteinaze şi peptidaze la lucernă* este prezentat un inhibitor al activităţii enzimelor proteolitice din lucerna recoltată la începutul stadiului de înflorire şi anume, fluorura de fenilmetilsulfonil. S-a relevat imposibilitatea inhibării selective a unui singur tip de proteinază sau peptidază cu compuşii testaţi. Rezultatele au fost discutate în raport cu însilozarea lucernei.

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenţia, este aceea de a îmbunătăţi valoarea nutritivă a furajului, prin reducerea sau eliminarea proteolizei care are loc pe timpul însilozării.

Conform prezentei invenţii, acest lucru se realizează cu un aditiv pentru furaj constituit dintr-un ingredient activ pentru însilozare, eventual alături de alţi ingredienţi, în sine cunoscuţi, şi dintr-un inhibitor de enzimă protează, selectat dintre inhibitori de protează cisteinică şi inhibitori de protează aspartică sau amestecul lor, inhibitorul fiind de origine biologică.

Ingredientul activ, pentru însilozare, este un acid sau un ingredient de origine bacteriană.

Ingredientul bacterian este o specie de *Lactobacillus* şi/sau *Streptococcus* şi/sau *Pediococcus*, producătoare de acid lactic.

Inhibitorul de protează cisteinică este cisteina sau antipaina sau *trans*-epoxi-succinil-*L*-leucilamido (4-guanidino) butan, iar inhibitorul de protează aspartică este pepstatin.

Într-o variantă de realizare, aditivul conţine ambele tipuri de inhibitori, atât de protează cisteinică, cât şi de protează aspartică. El este conţinut într-un purtător lichid care conţine apă.

Ca utilizare a aditivului, invenţia descrie un procedeu de preparare a unui furaj care conţine acest aditiv, care constă în aceea că fie plante ierbacee, grăunţe de cereale, leguminoase sau orez, se însilozează împreună cu ingredientul activ de însilozare în prezenţa inhibitorului de protează, ales dintre inhibitorii

de protează cisteinică şi inhibitorii de protează aspartică, fie inhibitorul de protează cisteinică este aplicat pe iarba proaspăt cosită, înainte de însilozare.

Inhibitorul de protează cisteinică este aplicat într-o cantitate de 10÷130 μmoli/kg produs recoltat, iar inhibitorul de protează aspartică într-o cantitate de 1÷60 mg/kg de produs recoltat. La aplicarea inhibitorului valoarea *p*H-ului este între 3 şi 7,5.

Când este lichid, aditivul care conţine inhibitor de protează într-o cantitate de 1÷100 g la litru este aplicat într-un purtător care conţine apă, într-o doză de aplicare de 0,5÷5 l/t de furaj de tratat.

Se dau, în continuare, patru exemple concrete de realizare a invenţiei.

**Exemplul 1** (*diagnostic*). Pentru o mai bună înţelegere a invenţiei, sunt prezentate întâi o serie de date generale, urmând ca exemplele să facă referire la testele concrete efectuate pe anumite furaje:

Protează cisteinice şi aspartice pot fi identificate, conform indicaţiilor lui Storey şi Wagner, *Phytochemistry*, 25, No. 12, 2701 la 2709 (1986), care identifică proprietăţile proteazelor, conform *Recomandaţiilor IUPAC-IUB*.

Este preferat să fie utilizat un inhibitor al enzimelor proteaze cisteinice.

Orice ingredient activ adecvat poate fi inclus în aditivul de furaj din invenţie. Poate fi un ingredient chimic, cum ar fi un acid, de exemplu acid formic sau sulfuric sau amestecuri ale acestora, sau un ingredient de origine bacteriană. Ingredientele bacteriale care sunt foarte potrivite includ specii producătoare de acid lactic de *Lactobacillus Streptococcus, Pediococcus acidilactici* şi *Pediococcus pentosaceus*, în special specii de *Lactobacillus plantarum*. O specie deosebit de utilă pentru însilozarea multor materiale este specia de *Lactobacillus plantarum* **MTD1**, din care a fost depusă o cultură la National Collection of Industrial Marine Bacteria (**NCIMB**), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, GB, nr. NCIMB 40027. Depunerea s-a făcut pe 12.11.1986 şi a fost acceptată ca depozit pentru intenţia de brevetare pe 20.07.1988, *Formularul Internaţional* conform Tratatului de Budapesta, fiind eliberat pe 25.07.1988.

Alte tulpini adecvate includ tulpini din speciile *Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus caseii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus brevis, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Streptococcus faeciu, Streptococcus faecalis, Lactobacillus amylophilus, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus* şi, în special soiul *Lactobacillus amylophilus* No. NCIMB 11546 tulpină *Streptococcus lactis* nr. NCIMB 6681 şi tulpină *Streptococcus thermophilus* nr. NCIMB 8510. Aceste tulpini sunt accesibile publicului.

Inhibitorii de protează cisteinică preferaţi includ cistetinele antipaina şi, mai ales, epoxizi peptidici, cum ar fi, *trans*-epoxi-succinil *L*-leucil-amido (4-guanidino) butan (**E64**). Într-o formă preferată a invenţiei, cultura de însilozat este tratată ca un inhibitor de protează aspartică, în plus, faţă de inhibitorul de protează cisteinică pentru a se obţine un efect inhibitor crescut. Inhibitorii de protează aspartică potriviţi includ pepstatina A.

**E-64** poate fi obţinut conform lucrării lui Hanada et al., Agric. Biol. Chem. 42 (3) 529 la 536 (1978). Cistatina a fost descrisă de Fossum et al., Arch. Biochem. Biophys. 125, 367, 1968. Apoi a fost purificată şi caracterizată de Sen et al. Arch. Biochem. and Biophysica 1568, 623 (1973). Antipaina este descrisă de Suda et al., J.Antibiotics 23, 259 (1970).

Preferabil, inhibitorul de protează cisteinică este aplicat recoltei care urmează a fi însilozată într-o cantitate în intervalul de la 10 la 130 μmoli/kg produs recoltat. Preferabil, inhibitorul este aplicat la un *p*H în domeniul 3 la 7,5. Când inhibitorul este aplicat ca inhibitor de protează, aspartică, cele două substanţe sunt aplicate de dorit împreună, deşi acestea pot fi aplicate separat în oricare ordine. Preferabil, inhibitorul de protează aspartică este aplicat într-o cantitate în domeniul 1 la 60 mg/kg recoltă.

Însilozarea este realizată cel mai potrivit în astfel de condiţii, încât orice alimentare cu oxigen este limitată sau oxigenul este în fapt exclus.

Aditivul de furaj din invenţie poate fi aplicat sub formă de lichid sau de solid ca particule. Când se face aplicarea ca lichid, purtătorul va cuprinde apă şi opţional, de

exemplu un alcool inferior, de exemplu 1 - propanol; pe când atunci când aplicarea se face ca solid, purtătorul va fi un material solid. În general, aditivii de aplicat ca solide vor fi furnizaţi color, care îl utilizează ca formulări complete incluzând purtătorii. Totuşi, când aditivul va fi aplicat sub formă de lichid, utilizatorului i se va furniza, în general, ingredientul activ de suspendat, într-un volum adecvat de apă, înainte de utilizare.

Când aditivul din invenţie este aplicabil ca solid, poate fi utilizat ca purtător orice material potrivit în aditivul de furaj din invenţie. Exemple de purtători adecvaţi includ cereale, cum ar fi ştiuleţi de porumb măcinaţi, orz şi grâu măcinat sau alte materiale, cum ar fi piatră de var, argilă, cretă, carbonat de magneziu sau talc.

În plus, faţă de purtători, ingredienţi activi şi inhibitori de protează, aditivii de furaj vor conţine, în general, şi alte materiale adăugate pentru o diversitate de motive. Orice alt material adăugat poate fi inclus drept alt component în ingredientul activ din invenţie. Materialele suplimentare includ hrănitori (care pot fi zaharuri ca zaharoză, lactoză, etc.); factori de creştere care sunt necesari pentru dezvoltarea unor bacterii (incluzând extract de drojdie, suc de porumb opărit, vitamine şi aminoacizi); materiale adăugate pentru a proteja viabilitatea bacteriilor; anti-oxidanţi; materiale pentru a asista preluarea de oxigen şi uleiuri şi alte materiale pentru a reduce tendinţele de prăfuire a aditivilor sau pentru a mări aderenţa la recoltă.

Proporţiile relative de purtător şi ingredient activ incluse într-un aditiv de furaj depind de aditiv şi de activitatea sa.

Atunci când este aplicat sub formă de solid, aditivul din invenţie este alimentat la nutreţ, într-o proporţie de 0,1 kg la 5 kg pe tonă de nutreţ de tratat, preferabil în intervalul 0,2 kg la 1 kg pe tonă. Atunci când este aplicat ca lichid, aditivitul este alimentat, preferabil la o proporţie în intervalul 0,5 l la 5 l pe tonă de nutreţ de tratat, ingredientul activ fiind adăugat la apă, într-o cantitate în intervalul 1 g la 100 g pe litru. Orice instrument de aplicare adecvat poate fi utilizat pentru a fi aplicat aditivul di invenie, fie sub formă de solid, fie sub formă de lichid.

Aditivul de furaj din invenţie poate fi utilizat pentru a produce furaj din orice material, inclusiv din recoltele menţionate mai înainte în această descriere. Totuşi, el este deosebit de util pentru însilozarea plantelor ierbacee.

Extracte de iarbă de secară sunt purificate de 60 de ori prin precipitare cu sulfat de amoniu, filtrare pe gel şi cromatografie cu schimbători de ioni. Se constată că activităţile enzimei astfel purificate sunt heterogene, dar totuşi împărtăşesc modele similare de inhibare cu diverşi inhibitori proteazici (tabelul 1). O inhibiţie importantă a fost găsită numai pentru p-clormercuribenzoat, un inhibitor de protează cisteinică. S-a găsit inhibiţie, de asemenea, dar într-o măsură cu mult mai mică cu pepstatin, un inhibitor de proteaze aspartice. Nu a fost detectată inhibiţia cu fluorură de fenilmetilsulfonil, un inhibitor de protează serinică. Din aceste date s-a conchis că, clasa majoră de proteaze prezente în iarba de secară sunt proteazele cisteinice.

*Tabelul 1*

| Inhibitor | "Ţintă" enzimă | Concentraţie | Inhibiţie % |
|---|---|---|---|
| PCMB | Cisteină | 1 mM | 100 |
| IODAA | Cisteină | 1 mM | 10 |
| PMSF | Serină | 1 mM | 2 |
| Pepstatin | Aspartic | 5 μg/ml | 17 |

*Abrevierile din tabelul 1*

PCMB: Parachlormercurilbenzoat
PMSF: Fluorură de fenilmetilsulfonil
IODAA: Acid iodacetic

**Exemplul 2.** Exemplul 1 este repetat, utilizând extracte de iarbă de secară tamponate. Extractele sunt incubate la diferite *p*H-uri în prezenţa unui amestec de antiobiotice, incluse pentru a preveni fermentarea pe timpul incubărilor. Inhibitorii de protează utilizaţi sunt specifici pentru diferite clase de proteaze şi sunt microbieni ca origine.

Rezultatele sunt sumarizate în tabelul 2. Inhibarea autolizei este mai puţin marcată decât se observă la preparatele semi-purificate din exemplul 1. Totuşi, din nou inhibarea a fost detectată, numai utilizând **E-64** (un inhibitor specific de protează cisteinică) şi pepstatin.

*Tabelul 2*

| Inhibitor | "Ţintă" enzimă | Concentraţie | *p*H | Inhibiţie % |
|---|---|---|---|---|
| E-64 | Cisteină | 10 $\mu$M | 4 | 13 |
| Pepstatin | Aspartică | 5 $\mu$M/ml | 5 | 47 |
| Aprotinin | Serină | 5,6 TIU | 6 | 0 |
| A-PMSF | Serină | 130 $\mu$M | 6 | 0 |

Abrevieri în tabelul 2
E-64: *trans*-epoxi-succinil-*L*-leucil-amido (4-guanidino) butan
A-PMSF: (clorură de p-amidinofenil) metilsulfonil
TIU: unitate inhibitorie a tripsinei

**Exemplul 3.** Iarba de secară perenă (substanţă uscată (SU) 279 g/kg; carbohidrat solubil în apă 113 g/kg SU; azot total 26,5 g N/kg SU; azot solubil 433 g/kg N) este însilozată. Iarba este însilozată cu sau fără tratament cu acid formic (1,5 g/kg nutreţ) cu scopul de a însiloza iarba la *p*H 6,25 sau *p*H 5. La fiecare *p*H au fost impuse ierbii şase tratamente (vezi tabelul 3). Au fost utilizaţi patru inhibitori de protează diferiţi: **E-64**, un inhibitor de protează cisteină; Pepstatin, un inhibitor de protează aspartică; un extract apos de cartofi care conţine atât inhibitor de protează serină, cât şi cisteină; formaldehidă care reduce protoeliza prin formarea de reticulări reversibile între proteine. În total 36 de silozuri sunt umplute, silozurile fiind triplicate pentru fiecare tratament. Silozurile sunt sub forma unor cilindri de măsurare de 100 ml echipaţi cu valve bunsen şi în fiecare dintre aceste silozuri sunt însilozate 70 g iarbă.

Silozurile sunt deschise după 82 zile. Furajul apare bine însilozat fără daune vizibile. Analizele furajului sunt date în tabelele 4 şi 5.

Reducerea *p*H-ului ierbii însilozate utilizând acid formic, are un unic efect asupra compoziţiei furajului. Deşi există efecte semnificative ale tratamentului cu acid formic asupra concentraţiilor de acid lactic şi acid acetic şi etanol, aceste diferenţe apar din slaba calitate a fermentaţiei furajului însilozat după tratament, atât cu acid formic cât şi cu formaldehidă.

Motivele acestei situaţii nu sunt clare.

Inhibitorii de protează au şi ei un slab efect asupra fermentării furajului. Prin comparaţie cu furajele netratate, adăugarea de extract de cartof nu afectează distrugerea proteinei în siloz (tabelul 5). Aplicare de pepstatin la însilozare nu influenţează deloc calitatea furajului. Totuşi, **E-64**, inhibitorul de protează cisteinică reduce semnificativ ($P < 0,001$), cantităţile de N lichid (0,80 din N solubil de control) şi de N din amoniac (0,73 din N-amoniacal de control) obţinut în timpul însilozării.

Rezultatele acestor studii arată că proteazele cisteinice ce sunt tipurile majore de proteaze implicate în distrugerea proteinei în siloz şi că adăugarea de inhibitori specifici ai inhibitorilor de protează cisteinică, de origine microbiană pot reduce proporţia de proteoliză care are loc în siloz, fără a afecta în mod negativ producerea de acid lactic în furaj.

*Tabelul 3*

| Tratament | Concentraţie |
|---|---|
| Apă | - |
| E-64 | 10 $\mu$M |
| Pepstatin | 5 $\mu$g/ml |
| E-64 şi Pepstatin | - |
| Extras de cartof | Extras nediluat |
| Formalină | 3 g/kg iarbă |

*Tabelul 4*

| Tratament | SU | *p*H (g/kg) | WSC | Lac | Ac (g/kg DM) | Et |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Însilozat la pH 6,2* | | | | | | |
| Control | 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 |
| Cartof | 244 | 3,72 | 30,0 | 124 | 23,1 | 7,22 |
| Formaldehidă | 254 | 3,76 | 29,6 | 115 | 20,8 | 2,67 |
| *Însilozat la pH 5,0* | | | | | | |
| Control | 250 | 3,69 | 30,2 | 124 | 22,1 | 0,5 |
| E-64 | 249 | 3,72 | 30,2 | 115 | 19,6 | 0,92 |
| Pepstatin | 251 | 3,72 | 29,9 | 115 | 21,0 | 0,5 |
| E-64 + Pepstatin | 244 | 3,80 | 30,9 | 102 | 17,5 | 2,25 |
| Cartof | 247 | 3,74 | 30,8 | 110 | 24,2 | 13,7 |
| Formaldehidă | 252 | 4,49 | 29,7 | 51 | 19,3 | 18,5 |
| SE | 0,5 | 0,086 | 0,60 | 7,0 | 1,16 | 1,06 |

Abrevieri în tabelul 4
SE: Eroare Standard Medie pentru 6 Observări
Lac: lactat
Ac: Acetat
ET: Etanol
WSC: Carbohidrat Solubil în Apă

*Tabelul 5*

| Tratament | Total N (gN/kg DM) | N Solubil (gN/kg N) | N-amoniacal (gN/kg N) |
|---|---|---|---|
| *Însilozat la pH 6,2* | | | |
| Control | 26,9 | 535 | 88,5 |
| E-64 | 26,3 | 424 | 68,3 |
| Pepstatin | 27,1 | 547 | 79,6 |
| E-64 + Pepstatin | 26,8 | 454 | 54,5 |
| Cartof | 26,2 | 524 | 86,9 |
| Formaldehidă | 24,4 | 528 | 85,6 |
| *Însilozat la pH 5,0* | | | |
| Control | 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 |
| Cartof | 27,1 | 522 | 68,2 |
| Formaldehidă | 26,7 | 518 | 100,8 |
| SE | 0,49 | 2,4 | 0,48 |

Abrevieri în tabelul 5
SE: Eroare Standard Medie pentru 6 Observări

**Exemplul 4.** Iarba de secară perenă este tocată la aproximativ 2 cm lungime şi se adaugă 20 ml de apă sau o soluţie apoasă, aşa cum se descrie mai jos, la 70 g de iarbă. Amestecul este comprimat şi introdus în silozuri închise ermetic faţă de accesul aerului şi se menţine la temperatura camerei pe durata experimentului. Iarba de secară conţine 190 g/kg materie uscată, 241 g/kg carbohidrat solubil în apă, faţă de materia uscată, conţinut total de azot 42,5 g/kg materie uscată şi conţinut de azot solubil 487 g/kg de azot. Azotul remanent fiind prezent în principal în proteină. Cei 20 ml de apă sau soluţie conţinuţi s-au dovedit a fi suficienţi pentru prepararea inhibitorului de enzimă şi/sau bacterial pentru a da cantităţile în micrograme pe gram de iarbă proaspătă, arătate în tabelul următor.

*Tabelul 6*

| Tratament | Concentraţie | | | |
|---|---|---|---|---|
| | μg/g | iarbă proaspătă | μg/g | iarbă proaspătă |
| Apă (Control) | - | | - | |
| E-64 | 11,25<br>22,5<br>45,0 | | 0,03<br>0,06<br>0,12 | |
| Pepstatin | 30,0<br>(Pepstatin) (E-64) | | 0,04 | |
| Pepstatin | 30,0 | 22,5 | 0,04 | 0,06 |
| E-64 | | | | |
| Antipain | 32,0 | | 0,04 | |
| Cistatin | 1,2 | | 0,9 | |
| 'ECOSYL' | 3 l/t (2,85 g/l) | | | |
| 'ECOSYL E-64 | 'ECOSYL' aplicat în proporţia de mai sus<br>aplicat 22,5 μg/g iarbă | | | E-64 |

**ECOSYL** este un aditiv de furaj accesibil comercial pentru o suspensie apoasă proedusă de *Imperial Chemical Industries PLC.* **ECOSYL** este o marcă de comerţ a *Imperial Chemical Industries PLC.* Produsul conţine drept constituent activ major specific **NCIMB 48027** *L.plantarum* liofilizat împreună cu hrănitori. Toate tratamentele au fost triplicate. Silozurile au fost deschise după 50 zile şi furajele au apărut a fi bine însilozate fără daune vizibile. Pepstatinul este un inhibitor de protează aspartică. Antipaina este un inhibitor al proteazelor cisteinice şi serinice şi cistatinul este un inhibitor de proteaze cisteinice. Despre acestea se crede că se leagă echimolecular cu proteazele. În tabele următoare nici un azot proteinic (azot solubil) nu include amoniac. SE înseamnă eroare stardard şi în fiecare tabel este dată pentru trei observări. La înseamnă lactat. Aceasta înseamnă acetat şi Et înseamnă etanol. Lactatul şi acetatul sunt exprimaţi ca acizi liberi. Investigarea produşilor de însilozare arată că inhibitorii de protează au un mic efect asupra fermentării furajului şi producerea de acid lactic nu a fost afectată. În următoarele tabele SU înseamnă substanţă uscată.

*Tabelul 7*

*Efectul creşterii concentraţiilor de E-64 asupra fracţiilor azotate ale furajului*

| Concentraţia E-64 μg/g iarbă | N-total gN/kg SU | N-non-proteic gN/kgN | N-amoniacal gN/kgN |
|---|---|---|---|
| 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 |

SE, eroare standard pentru trei observări. N-non-proteic nu include N-amoniacal.

Pentru furaj tratat cu **E-64** la 11,25 μg/g iarbă, conținutul de N-solubil (N non-proteinic) este redus la 87% din N probei de control. Pentru furajele tratate cu **E-64** 45,0 μg/g iarbă, conținutul solubil este redus la 75% din N solubil al probei de control. Conținutul de N-amoniacal al furajelor tratate cu **E-64** 45,0 μg/g iarbă este redus la 70% din cel al N-amoniacal.

*Tabelul 8*

*Efectele creșterii concentrațiilor de E-64 asupra compoziției furajului*

| E-64 | Proporția de aplicare | *p*H furaj | SU | WSC | La | Ac | Eth |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0<br>11,25<br>22,5<br>45,0 | 3,48<br>3,41<br>3,48<br>3,40 | 156<br>158<br>163<br>164 | 20,6<br>24,5<br>24,2<br>31,3 | 184<br>202<br>188<br>175 | 22,5<br>19,3<br>22,2<br>18,4 | 16,0<br>38,9<br>33,3<br>35,5 |
| | SE | 0,02 | 0,15 | 1,25 | 13,5 | 2,94 | 5,57 |

SU înseamnă substanță uscată în grame pe kilogram și
WSC înseamnă carbohidrat solubil în apă;
La înseamnă acid lactic;
Ac înseamnă acid acetic;
Eth înseamnă etanol.

Toate sunt exprimate ca grame pe kg de substanță uscată.
Prin substanță uscată se înțelege reziduul după deshidratarea ierbii sau furajului după caz.

*Tabelul 9*

*Efectul E-64 și pepstatinului asupra compoziției furajului*

| Tratament | N-total gN/kgSU | N-non-proteinic gN/kgN | N-amoniacal gN/kgN |
|---|---|---|---|
| Control | 407 | 643 | 72,4 |
| E-64 22,5 μg iarbă | 366 | 556 | 70,8 |
| Pepstatina 30 μg/g iarbă | 435 | 521 | 60,6 |
| E-64 (30 μg/g iarbă) și Pepstatin (22,5 μg/g iarbă) | 428 | 438 | 62,9 |
| SE | 1,51 | 0,63 | 0,54 |

Pepstatinul reduce cantitățile de N solubil (81% din N controlului). Reducerea în cantitatea de N solubil din furaje este mai mare la aplicare de pepstatin și E-64, împreună comparativ cu aplicarea fiecărui inhibitor singur. Pentru furajele tratate cu pepstatin și E-64 împreună, conținutul de N-solubil este redus la 68% din N-solubil al controlului.

*Tabelul 10*

*Efectele E-64 şi pepstatinului asupra compoziţiei furajului*

| Tratament | *p*H furaj | SU | WSC | La | Ac | Eth |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3,48 | 156 | 20,6 | 184 | 22,5 | 16,0 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă | 3,48 | 163 | 24,2 | 188 | 22,2 | 33,3 |
| Pepstatin 30 μg/g iarbă | 3,61 | 164 | 17,5 | 168 | 16,1 | 36,0 |
| E-64 30 μg/g iarbă şi Pepstatin 22,5 μg/g iarbă | 3,56 | 163 | 11,1 | 171 | 23,9 | 38,9 |
| SE | 0,02 | 0,12 | 0,66 | 8,48 | 5,39 | 8,68 |

*Tabelul 11*

*Efectele inhibitorilor de protează cisteinică asupra fracţiilor azotate ale furajului*

| Tratament | N-total gN/kg SU | N-non-proteic gN/kgN | N-amoniacal gN/kgN |
|---|---|---|---|
| Control | 407 | 643 | 72,4 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă | 366 | 556 | 70,8 |
| Cistatină 1,2 μg/g iarbă | 406 | 571 | 75,7 |
| Antipaină 32 μg/g iarbă | 411 | 524 | 69,1 |
| SE | 1,02 | 2,40 | 0,70 |

Conţinutul de N solubil al furajelor tratate cu cistatină este redus la 88% din N solubil al controlului. Conţinutul de N solubil al furajului tratat cu antipaină este redus la 81% din N solubil al controlului.

*Tabelul 12*

*Efectele inhibitorilor de protează cisteinică asupra compoziţiei furajului*

| Tratament | pH furaj | SU | WSC | La | Ac | Eth |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3,48 | 156 | 20,5 | 184 | 22,5 | 10,0 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă | 3,48 | 163 | 24,2 | 190 | 22,2 | 33,3 |
| Antipaină 32 μg/g iarbă | 3,55 | 161 | 24,1 | 163 | 28,8 | 4,31 |
| Cistatină 1,2 μg/g iarbă | 3,65 | 160 | 17,2 | 183 | 29,4 | 4,55 |
| SE | 0,03 | 3,09 | 0,93 | 19,2 | 8,57 | 5,07 |

*Tabelul 13*

*Efectele E-64 şi "ECOSYL" asupra fracţiilor azotate ale furajului*

| Tratament | N-total gN/kg SU | N-non-proteic gN/kgN | N-amoniacal gN/kgN |
|---|---|---|---|
| Control | 407 | 643 | 72,4 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă | 366 | 586 | 70,8 |
| ECOSYL 8,55 μg/g iarbă | 378 | 533 | 63,2 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă şi ECOSYL 8,55 g/l | 355 | 421 | 53,3 |
| SE | 0,79 | 1,51 | 0,79 |

Pentru furajul tratat cu **ECOSYL** cantitatea de N solubil a fost redusă la 82% din N solubil al controlului. Pentru furajul tratat cu **E-64** şi **ECOSYL** a fost determinată o reducere mai mare a conţinutului în N solubil, comparativ cu acela pentru fiecare tratament aplicat separat. La adăugarea de **ECOSYL** şi **E-64** împreună, conţinutul de N solubil al furajului este redus la 65% din cel al N-solubil al controlului.

*Tabelul 14*

*Efectele E-64 şi ECOSYL asupra compoziţiei furajului*

| Tratament | *p*H furaj | SU | WSC | La | Ac | Eth |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3,48 | 156 | 20,6 | 184 | 22,5 | 16,0 |
| E-64 22,5 μg/g iarbă | 3,48 | 163 | 24,1 | 188 | 22,2 | 33,3 |
| ECOSYL 8,55 μg/g iarbă | 3,63 | 154 | 16,0 | 149 | 42,6 | 11,2 |
| ECOSYL 8,55 μg/g iarbă şi E-64 22,5 μg/g iarbă | 3,45 | 164 | 28,9 | 132 | 42,0 | 30,2 |
| SE | 0,03 | 0,11 | 0,92 | 13,9 | 8,53 | 5,45 |

*Concluzii*

Rezultatele arată că proteazele cisteinice şi aspartice sunt active pe timpul însilozării. Adăugarea de inhibitori de protează cisteinică şi aspartică specifică, de origine biologică, reduce proporţia proteolizei în siloz, fără a afecta în mod negativ producerea de acid lactic în siloz.

Reducerea conţinutului de N solubil la furajul tratat cu **ECOSYL**, comparativ cu acela pentru furajele de control, poate fi atribuit efectului *p*H-ului asupra enzimelor

proteolitice din iarba de secară (arătat a fi cu activitate optimă la *p*H 5 la 7). O reducere mai rapidă a *p*H-ului în timpul etapelor inițiale de însilozare, ar fi fost de așteptat pentru furajele tratate cu **ECOSYL**, comparativ cu furajele de control.

O combinație de inhibitori de protează cisteinică și aspartică sau de inhibitor de protează cisteinică și **ECOSYL** apare a reduce proteoliza pe timpul însilozării într-o măsură mai mare decât tratamentele cu un singur agent.

## Revendicări

1. Aditiv pentru furaj, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un ingredient activ pentru însilozare, eventual alături de alți ingredienți, în sine cunoscuți, și dintr-un inhibitor de enzimă protează, selectat dintre inhibitori de protează cisteinică și inhibitori de protează aspartică sau amestecul lor, inhibitorul fiind de origine biologică.

2. Aditiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** ingredientul activ pentru însilozare este un acid sau un ingredient de origine bacteriană.

3. Aditiv, conform revendicărilor 1 și 2, caracterizat prin aceea că, ingredientul bacterian este o specie de *Lactobacillus* și/sau *Streptococcus* și/sau *Pediococcus*, producătoare de acid lactic.

4. Aditiv conform revendicărilor 1÷3, **caracterizat prin aceea că** inhibitorul de protează cisteinică este cisteină sau antipaina sau *trans*-epoxi-succinil-*L*-leucilamido (4-guanidine) butan.

5. Aditiv conform revendicărilor 1÷4, caracterizat prin aceea că inhibitorul de protează aspartică este pepstatin.

6. Aditiv conform revendicărilor 1÷5, **caracterizat prin aceea că** conține ambele tipuri de inhibitori, atât de protează cisteinică, cât și de protează aspartică.

7. Aditiv conform revendicărilor 1÷6, **caracterizat prin aceea că** este conținut într-un purtător lichid, care conține apă.

8. Procedeu pentru prepararea unui furaj conținând aditivul din revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, fie plante ierbacee, grăunțe de cereale, leguminoase sau orez, se însilozează împreună cu ingredientul activ de însilozare în prezența inhibitorului de protează, ales dintre inhibitorii de protează cisteinică și inhibitorii de protează aspartică, fie inhibitorul de protează cisteinică este aplicat pe iarba proaspăt cosită, înainte de însilozare.

9. Procedeu conform revendicării 8, **caracterizat prin aceea că** innibitorul de protează cisteinică este aplicat într-o cantitate de 10÷130 $\mu$moli/kg produs recoltat.

10. Procedeu conform revendicărilor 8 și 9, **caracterizat prin aceea că** inhibitorul de protează aspartică este aplicat într-o cantitate de 1÷60 mg/kg produs recoltat.

11. Procedeu conform revendicărilor 8÷10, **caracterizat prin aceea că**, la aplicarea inhibitorului, valoarea *p*H-ului este între 3 și 7,5.

12. Procedeul conform revendicărilor 8÷11, **caracterizat prin aceea că** se aplică un aditiv lichid, care conține inhibitor de protează într-o cantitate de 1÷100 g la litru, într-un purtător care conține apă, într-o doză de aplicare de 0,5÷5 l/t de furaj de tratat.

Președintele comisiei de examinare: **dr.ing.Paraschiv Adriana**
Examinator: **ing.Ionescu Bucura**

Grupa 2

Preț lei 7800

Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: "Societatea Autonomă de Informatică SAI" SRL