



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

78317

C (45) Patentoitu ja annettu
Patent julkaistu 10.07.1989

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 N 11/00, A 23 K 1/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

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

(21)	Patentihakemus - Patentansökning	- 834595
(22)	Hakemispäivä - Ansökningsdag	14.12.83
(23)	Alkuperä - Giltighetsdag	14.12.83
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	21.06.84
(44)	Nähtäväsipanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.03.89
(86)	Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31)	Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	20.12.82
	Ranska-Frankrike(FR)	8221302 Toteennäytetty-Styrkt

(71) Sanders S.A., 17, quai de l'Industrie, Athis-Mons, Essonne, Ranska-Frankrike(FR)

(72) Mohamed Bakri Assoumani, Les Ulis, Ranska-Frankrike(FR)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymien stabiloimiseksi, näin stabiloidut entsyymit ja rehut, joissa on sellaisia entsyymejä ja jotka on tarkoitettu yksimahaisille eläimille - Förfarande för stabilisering av β -glukanas- och α -amylasenzym, på detta sätt stabiliserade enzymer och foder innehållande dessa enzymer och avsett för monogastriska djur

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää nestemäisten entsyymien stabiloimiseksi ja sellaisia entsyymeitä sisältäviä rehuja.

Keksinnön mukaisesti nestemäiset entsyymit sumutetaan jatkuvasti sekoitetulle kiinteälle kantajalle, joka on esimerkiksi maissin alkoholikäymisen sivutuotetta. Keksintö soveltuu yksivatsaisille eläimille tarkoitettujen rehujen valmistukseen.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en metod för stabilisering av enzymer i vätskeform och foder innehållande sådana enzymer. Enligt uppfinningen finfördelas enzymer i vätskeform kontinuerligt på en blandad, fast bärare, som t.ex. är en biprodukt av alkoholjäst majs. Uppfinningen är lämplig att användas vid tillverkning av foder avsett för djur med en mage.

Menetelmä β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymien stabiloimiseksi, näin stabiloidut entsyymit ja rehut, joissa on sellaisia entsyymejä ja jotka on tarkoitettu yksimaisille eläimille

5

Tämä keksintö koskee menetelmää β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymien stabiloimiseksi ja näin saatuja stabiloituja entsyymeitä. Lisäksi se koskee rehuja, joissa on tällaisia entsyymeitä ja jotka on tarkoitettu etenkin yksimahaisten eläinten ravinnoksi.

Entsyymeitä käytetään nykyisin yhä enemmän teollisuudessa, erityisesti bioteknisissä käymisprosesseissa. Tämän takia on viime vuosina ollut havaittavissa yhä aktiivisempien ja hinnaltaan yhä edullisempien entsyymien tuotanto: tämä on johtanut etenkin siihen, että samassa prosessissa käytettävä määrä vähenee, mikä johtaa tuotantokustannusten laskuun.

Yleensä entsyymeitä on saatavana kaupallisesti nesteinä tai jauheena, kuivattuina tai erilaisten sokerimolekyylien kanssa kuivattuina, mikä lisää niiden lämpösäilyvyyttä jälkimmäisessä tapauksessa. Useimmiten kuivaus aiheuttaa entsyymiaktiivisuuden laskua, mikä taas nostaa entsyymiaktiivisuuden kustannuksia ja sen seurauksena prosessin kustannuksia.

Tuotantotasolla entsyymeitä käytetään pääasiassa seuraavassa kahdessa muodossa: vapaina tai eri tekniikoilla immobilisoituina. Immobilisoiduissa entsyymeissä erotetaan tavallisesti entsyymit, jotka on sidottu adsorption avulla eli kovalenttisella sidoksella kuten esimerkiksi glukoozi-isomeraasi, jota myy ja valmistaa amerikkalainen yhtiö CPC International Inc., ja entsyymit, jotka on suljettu kapsleihin tai väliaineeseen kuten esimerkiksi glukoozi-isomeraasi, jota valmistaa ja myy italialainen yhtiö Snam Progetti. Kuten voidaan huomata, entsyymi voidaan immobilisoida kahdella yllä kuvatulla tavalla.

Yleensä entsyymien kiinnittäminen suoritetaan, kun substraatti on liukoinen tai dispergoituva: tällä tavoin se voi päästä suoraan kosketuksiin entsyymien kanssa, koska mitään fysikaalista estettä ei ole.

- 5 Nämä päämäärät ja tavoitteet sekä muut myöhemmin ilmenevät seikat saavutetaan tällä keksinnön mukaisella menetelmällä nestemäisten entsyymien stabiloimiseksi, johon kuuluu tietyn entsyymimäärän sumuttaminen jatkuvasti kiinteään kantajan pinnalle.
- 10 Sekä ihmis- että eläinruokinnassa on useissa julkaisuissa kiinnitetty huomiota erilaisten entsyymien käyttöön fysiologisten puutostilojen korjaamiseksi: näin siipikarjalle tarkoitettu ohra-annokset täydennetään α -amylaasilla tai β -glukanaasilla, tai märehtijöille tarkoitetut viljarehuannokset täydennetään proteaaseilla, α -amylaasilla tai sellulaasilla. Mutta tulokset eivät aina ole vakuuttavia, toisin sanoen lisätyllä entsyymeillä ei ole saavutettu mitään etua ja joskus ne ovat jopa vaikuttaneet negatiivisesti.
- 15 Tarvittava määrä biologisesti vaikuttavia nestemäisiä entsyymeitä osoittautuu usein hyvin pieneksi: yleensä vähemmän kuin 150 ml 100 kg kohti lopullista ravintoainetta. Tämä muodostaa teknologisen esteen nestemäisten entsyymien käytölle ruoka-ainetuotantasolla.
- 20 Toisaalta nestemäisten entsyymien säilytysvaatimukset ovat suhteellisen tiukat, sillä ne on varastoitava $+4^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa.
- 25 Tämän keksinnön tarkoituksena on myös luoda menetelmä β -glukanaasi- ja α -amylaasi-entsyymien stabiloimiseksi, jonka avulla niitä voitaisiin säilyttää huoneen lämpötilassa.
- 30 Keksinnön kohteena on stabiloidut β -glukonaasi- ja α -amylaasi-entsyymit, jotka eivät siis menetä aktiivisuuttaan niitä sisältävän ravintoaineen eri tuotantovaiheissa ja riippumatta ravintoaineen olomuodosta (jauho, rakeet, tai muruset).
- 35

Keksinnön kohteena on myös rehut, jotka sisältävät stabiloituja β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymejä, jotka ovat tehokkaita in vivo ja jotka on tarkoitettu erityisesti yksimahaisten eläinten ruokintaan.

- 5 Nämä päämäärät ja tavoitteet sekä muut myöhemmin ilmenevät seikat saavutetaan tällä keksinnön mukaisella menetelmällä β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymien stabiloimiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että entsyymit sumutetaan kiinteälle kantajalle, jonka vesi-
- 10 aktiviteetti on enintään 0,55 ja joka on kasvimateriaalin alkoholikäymisen sivutuote, joka mahdollisesti on lopuksi tislattu.

Entsyymimäärä on edullisesti 0,5-100 ml yhtä kg kohti kiinteää kantajaa.

- 15 Kiinteä kantaja saadaan edullisesti maissinjyvien alkoholikäymisestä tai alkoholin tuotannosta. Siitä käytetään yleensä anglosaksista nimitystä "Corn distillers".

Mieluiten kiinteää kantajaa käsitellään sitä ennen orgaanisilla hapoilla.

- 20 Kiinteä kantaja on edullisesti 1 millimetriä pienempinä jyväsinä.

- Kuten jo on esitetty, tämä keksintö koskee myös nestemäisiä entsyymeitä, jotka on stabiloitu sellaisella menetelmällä, se käsittelee myös niitä sisältäviä ruoka-
- 25 aineita.

- Kun nestemäistä entsyymiä sumutetaan kiinteän kantajan pinnalle, joka on peräisin maissinjyvien alkoholikäymisestä se adsorboidaan kiinteän kantajan pinnalle niin, että se voidaan vapauttaa vettä sisältävässä ympäristössä substraattia hydrolysoimaan.
- 30 Tämän keksinnön mukaiset kiinteät kantajat on jo käsitelty orgaanisilla hapoilla kaikkien kontaminaatioiden estämiseksi.

- Kuten edellä on esitetty nämä kiinteät kantajat
- 35 muodostuvat pääasiassa sivutuotteina joko etanolin tuo-

- tannosta kuten tislaamon jätemäskeinä (distiller's spent grains tai DSG) tai maissin alkoholikäymisestä kuten tislauksen jälkeen talteen otetuista proteiinifraktioista. Näihin fraktioihin kuuluvat tislausmäskit ja liuokset
- 5 fraktiot. Tässä tapauksessa pääasialliset sivutuotteet ovat maissitisolaamon mäskit, joihin sisältyvät liukoiset ainekset (corn distiller's dried grains with solubles tai CDGS), maissitisolaamon kuivatut mäskit (corn distiller's dried solubles tai CDS). Toisentyypisistä kiinteistä
- 10 kantajista voidaan mainita maissigluteenipohjaiset tuotteet (corn gluten feed tai CGF). Näiden eri tuotteiden pääasiallisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien keskiarvot ja keskimääräinen koostumus on ryhmitelty alla olevassa taulukossa I.

Taulukko

	Vesi %	Kokonais- typpi	Rasva-ai- neet	Sellu- loosa	Käivennäis- aineet	Kokonais- proteiinit %	Veden aktiivi- suus (A_w)	pH
C.G.F.	10,3	20,5	4,8	7,8	6,7	-	0,52	4,38
C.D.G.S.	9,2	27,3	7,6	7,3	5,9	-	0,50	4,46
C.D.G.	8	29,5	8	12,8	-	-		
D.S.G.	6,8	27,5	9,8	7,5	4,5	17,5		
C.D.S.	10	29,8	-	4,2	-	-		

Kaikki prosentit ovat painoprosentteja

Taulukossa I esitettyjen kiinteiden kantajien pääasialliset ominaisuudet ovat

- suhteellisen matala pH, noin 5;
- alhainen veden aktiivisuus (A_w), mieluiten
5 alle 0,55;
- alhainen rasva-ainepitoisuus, jotta välttyt-
 täisiin kaikilta entsymaattisilta, vapaita
radikaaleja synnyttäviltä peroksidaatioilta, jotka
denaturoivat stabiloitavia nestemäisiä entsyymeitä.

10 Toisaalta näillä kiinteillä kantajilla ei saa olla
in situ-entsymaattista aktiivisuutta, joka voisi häiritä
stabiloitujen entsyymien aktiivisuutta.

Kiinteän jatkuvasti sekoitettava kantajan pintaan
sumutettujen nestemäisten entsyymien määrä on kertaluokkaa
15 0,5 - 100 ml kg:ta kohti kantajaa. Itse asiassa maksi-
maalista sumutusprosenttia rajoittaa toisaalta se veden
maksimaalinen aktiivisuus (A_w), jossa mikro-organismit
kasvavat mitä on vältettävä- ja toisaalta kantajan massan
kasvu ja samanaikaisesti juoksevuuden aleneminen.

20 Seuraavat esimerkit osoittavat vain asiantuntijalle
tämän keksinnön toteuttamistavan.

Esimerkki 1

"24 ACCELA-COTA DE MANESTY"-tyyppiseen laitteeseen,
jota käytetään tablettien päällystämiseen ja jonka suuttimet,
25 joiden kautta ruiskutetaan normaalisti kuumaa ilmaa kuiva-
ukseen, on suljettu, laitetaan 6 kg maissitisolaamon kuivattua
mäskiä (CDG). Koko ajan koneen pyöriessä noin 12 kierroksen
nopeudella minuutissa, sumutetaan 6 minuutin ajan nestemäistä
 β -glukanaasia ruiskupistoolilla, joka on varustettu hal-
30 kaisijaltaan 0,8 mm:n suuttimella. Sumutusnopeus on 50 ml/min
 $3,5 \cdot 10^5$ Pascalin ilmanpaineella, Noin kolmen minuutin homo-
genisoinnin jälkeen rumpu pysäytetään ja kerätään talteen
stabiloitu nestemäinen β -glukanaasi.

Näin stabiloitua entsyymiä voidaan lisätä esimerkiksi
35 siipikarjan rehuun, joka voi sisältää ohraa 5-70 % painosta.

Alla olevassa taulukossa II on siipikarjalle tarkoitettu ohje, jossa on tämän keksinnön mukaista stabiloitua nestemäistä entsyymiä.

Taulukko

5	<u>Aineosat</u>	<u>Paino %</u>
	Maissi	31,9
	Ohra	30
	Soija	26,3
10	Liha	5
	Rasva-aine	4,3
	Vitamiinokivien-	
	näisyhdiste	1,5
	Stabiloitu nestemäinen	
15	entsyymi	1

Esimerkki 2

20 Vaakatasossa olevaan 5000 litran hihnasekoittajaan, jossa on 10 sumutussuutinta, lisätään 220 kg maissitisläämon äskiä, joka sisältää liukoisia aineita (CDGS), sekoittajan pyörimisnopeus ja 20 kierrosta minuutissa.

β -glukanaasin ja α -amylaasin seoksen sumuttaminen suoritetaan 6,5 minuutin aikana nopeudella 140 l/t 4,1 Pascalin ilmanpaineella.

25 3 minuutin homogenisoinnin jälkeen otetaan talteen stabiloitu nestemäinen entsyymiseos, joka voidaan lisätä 0,5-1 % painosta siipikarjalle tarkoitettuun rehuun, joka voi sisältää 5-70 % painosta ohraa.

30 Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä tuotetaan siis nestemäisiä kiinteän kantajan pintaan stabiloituja entsyymeitä kokonaisuus käsittää seoksen, jota voidaan käyttää rehun tuottamiseen etenkin yksivatsaisille eläimille kuten siipikarjalle.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä β -glukanaasi- ja α -amylaasientsyymien stabiloimiseksi, jotka säilyttävät aktiviteettinsa varastoinnin aikana, ja jotka on tarkoitettu eläinten rehuksi, t u n n e t t u siitä, että entsyymit sumutetaan kiinteälle kantajalle, jonka vesiaktiviteetti on enintään 0,55 ja joka on kasvimateriaalin alkoholikäymisen sivutuote, joka mahdollisesti on lopuksi tislattu.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteän kantajan pH-arvo on noin 5.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteän kantajan raekoon ja-
kauma on alle 1 mm.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sumutettujen entsyymien määrä on 0,5-100 ml yhtä kg kohden kiinteää kantajaa.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä kantaja on etanolin valmistuksen kiinteä sivutuote.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä kantaja on rankkia.
7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä kantaja on maissin alkoholikäymisen sivutuote.
8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-7 mukaisella menetelmällä stabiloitu β -glukanaasi- tai α -amylaasientsyymi.
9. Rehu, erikoisesti yksimahaisia eläimiä varten, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 0,5-1,5 paino-% vähintään yhtä β -glukanaasi- tai α -amylaasientsyymiä, joka on stabiloitu jollakin patenttivaatimuksen 1-7 mukaisella menetelmällä.

Patentkrav

1. Förfarande för stabilisering av β -glukanas- och α -amylasenzym, vilka bibehåller aktiviteten under lagring och vilka är avsedda till foder för djur, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymerna atomiseras på en fast bärare, vilken har en vattenaktivitet av högst 0,55 och vilken utgörs av en biprodukt av alkoholjäsning av ett vegetabiliskt material, vilken biprodukt eventuellt till slut destillerats.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta bäraren har ett pH-värde av cirka 5.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta bäraren har en granulometri under 1 mm.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att mängden av de atomiserade enzymerna är 0,5-100 ml per kg fast bärare.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta bäraren utgörs av en fast biprodukt av etanolframställning.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta bäraren utgörs av drank.

7. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta bäraren utgörs av en biprodukt av alkoholjäsning av majs.

8. β -glukanas- eller α -amylasenzym stabiliserad medelst ett förfarande enligt något av patentkraven 1-7.

9. Foder, i synnerhet för monogastriska djur, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar minst 0,5-1,5 vikt-% av minst en β -glukanas- eller α -amylasenzym, vilken stabiliserats medelst ett förfarande enligt något av patentkraven 1-7.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 1 572 761 (A 23 K 1/165).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 617 300 (A 23 k 1/00), 4 116 772 (C 07 G 7/02).