

Sposób uszlachetniania makuchów rzepakowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób uszlachetniania makuchów rzepakowych przeznaczonych do wykorzystania w żywieniu zwierząt, zwłaszcza drobiu, w szczególności kurcząt brojlerów i indyków.

Zaspokojenie potrzeb pokarmowych zwierząt na białko w Polsce charakteryzuje się ujemnym bilansem, co zmusza do stałego poszukiwania alternatywnych źródeł białka (Brzóska i in., 2010; Zaworska 2015. Białko pasz rzepakowych stanowi istotną pozycję w bilansie pasz białkowych i łagodzi ich niedobór. Polska jest potentatem w produkcji rzepaku. (Rękas i in., 2016). Nasiona tych roślin, a także produkty uboczne ich przetwarzania (poekstrakcyjna śruta rzepakowa, makuchy, wyłoki i ekspelery rzepakowe,) zawierają stosunkowo wysoki udział substancji antyodżywczych (ANF) do których należą (polisacharydy nieskrobiowe, kwas erukowy, glukozynolany, taniny, oligosacharydy, fityniany, inhibitory proteaz) ograniczających ich wykorzystanie w paszach dla zwierząt (Annison i Choc 1991; Bedford 2000; Smulikowska, 2003; Brzóska i in., 2010, Patyra i Kwiatek, 2015. Ponadto zawarty w paszach fosfor jest praktycznie niedostępny dla zwierząt, zwłaszcza monogastrycznych, dlatego mieszanki paszowe muszą być uzupełniane tym biopierwiastkiem. Odpowiednie zbilansowanie mieszanki pod względem zawartości fosforu jest bardzo istotne, gdyż jego niedobór obniża produktywność zwierząt, a wprowadzony w nadmiarze zwiększa jej koszt i negatywnie obciąża środowisko naturalne (Prasad i in., 2015). Pasze rzepakowe mogą być częściowym lub pełnym substytutem importowanej poekstrakcyjnej śruty sojowej w żywieniu określonych gatunków i grup zwierząt dopiero z zastosowaniem dodatków enzymatycznych lub po jej uszlachetnieniu. Już w 1962 roku Warden i Schaible (1962) wykazali, że egzogenna fitaza pozytywnie wpływa na mineralizację kośćca u kurcząt brojlerów. Kermanshahi i Abbasi Pour (2006), stosując w mieszankach z poekstrakcyjną śrutą rzepakową uzupełnioną preparatem enzymatycznym zawierającym ksylanazę i glukanazę w dawce 0,025%, uzyskali istotną poprawę przyrostów w okresie starter, z kolei Kucharski i in. (2002) twierdzą, że kurczęta brojlery najlepiej reagują na dodatek do paszy preparatów enzymatycznych redukujących działanie czynników antyżywniowych przez pierwsze 3-4 tygodnie życia. Poza stosowaniem dodatków enzymatycznych aby podnieść konkurencyjność pasz rzepakowych i ograniczyć oddziaływanie substancji antyodżywczych przeprowadza się procesy uszlachetniające Abd El-Hady, Habiba (2003). Mają one na celu poprawę wartości odżywczej, przyswajalności składników pokarmowych i zwiększenie możliwości ich wykorzystania jako pasz wysokobiałkowych w żywieniu zwierząt (Ciesiołka i in. 2005; Urbano i in. 2005; Ghavidel i Prakash, 2007; Gulewicz i in. 2008; Jezierny i in. 2010; Kasproicz-Potocka i in. 2012; Chilomer i in. 2013). Fermentacja jest prostym i tanim sposobem, przetwarzania i konserwacji materiałów paszowych. Przetworzenie następuje poprzez szybkie obniżenie pH w obecności kwasów organicznych. Jednakże w zależności od warunków tych procesów (temp., wilgotność,

czas, typ urządzeń) mogą one wpływać zarówno korzystnie jak i niekorzystnie na strawność tych składników (Li i in. 2002). Dlatego też stosuje się kultury starterowe - inokulanty zawierające wyselekcjonowane mikroorganizmy, ukierunkowując przebieg fermentacji i ograniczenie rozwoju negatywnej flory. Z licznych doniesień wynika, że do fermentacji najczęściej wykorzystuje się preparaty mikrobiologiczne – inokulanty, które szczególnie w pierwszych godzinach fermentacji ułatwiają proces fermentacji. Preparaty te zawierają także enzymy, amylazę lub celulazę, o które wydatnie poprawiają skuteczność przetwarzania. Enzymy bowiem mają za zadanie szybko i skutecznie uwolnić dodatkowe cukry z węglowodanów zawartych w materiale. Na szybkość i efektywność fermentacji może wpływać wiele czynników. Jednocześnie działanie fitazy na cząsteczkę fitynianu prowadzi do powstania fosforu oraz mio-inozytolu jako finalnego produktu hydrolizy (Żyła i in. 1995).

Najważniejszym aspektem wpływającym na efektywność fermentacji jest dostępność surowców do fermentacji, a więc zasobność podłoża w cukry (glukoza, mannoza, fruktoza i galaktoza) ulegające bezpośrednio fermentacji (Kasprowicz-Potocka, 2015; Zaworska i in, 2017). Istotne jest także ilość i rodzaj wprowadzonych komponentów i odpowiednie ich proporcje w stosunku do wody, jak również warunki procesu – pH środowiska, temperatura i dostęp tlenu, które przyczyniają się do wydajności procesu i namnażania czy też hamowania rozwoju mikroorganizmów. Dzięki nowym technologiom i rozwojowi mikrobiologii do fermentacji wykorzystać można różne szczepy bakterii, także drożdży oraz dodatków enzymatycznych, prowadzących proces bezpośrednio (bez wstępnej hydrolizy, scukrzania) i wykorzystujące różne substraty (cukry proste, pentozy, skrobię, różne źródła białka i substancje antyodżywcze).

Fermentacją poprawia się bezpieczeństwo żywności poprzez eliminację potencjalnie szkodliwych bakterii oraz rozkład substancji antyodżywczych, w tym także mykotoksyn. Zabieg ten oprócz podniesienia wartości odżywczej może generować syntezę witamin, przeciwutleniaczy i innych związków biologicznie czynnych (Rafter, 1995). Poprzez wytworzenie substancji zapachowych, poprzez tworzenie się kwasów organicznych i związków lotnych i redukcję najczęściej gorzkich ANF, fermentacja może zwiększać aromatyczność paszy oraz korzystnie wpływać na smakowość surowca, co wpływa na poprawę pobierania paszy przez zwierzęta. Dlatego w ostatnich latach fermentacja stała się obiektem zainteresowań wielu podmiotów zajmujących się żywieniem zwierząt.

W danych literaturowych dostępne są opracowania w których prowadzona była fermentacja mączki rzepakowej z użyciem bakterii oraz drożdży (*Rhizopus oligosporus*, lub kultury *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Bacillus subtilis*). Badania te wykazały, że proces fermentacji może zmniejszyć zawartość glukozynolanów - glukobrassyliny (o 97,3%), oligosacharydów (73%), ligniny i NDF (o 30%) i fitynianów (o 67%) w zależności od składu inokulum i warunków procesu (Bau i in. 1994, Chianga i in. 2010).

Znane są także rozwiązania, które przewidują wykorzystanie procesu fermentacji materiałów paszowych. Jednym z rozwiązań tego typu jest CN105994938 w którym fermentowano białko mączki kukurydzianej za pomocą masy bakteryjnej w ilości $1,0 \times 10^8$ cfu/ml do $1,0 \times 10^9$ cfu/ml. Sposób wytwarzania obejmuje następujące etapy:

5 przygotowanie mączki kukurydzianej do fermentacji, którą przesiewa się przez sito i tak wyselekcjonowany materiał zaszczepiania się w ilości 6% masy bakteriami przy stosunku suchej masy do wody 1:1. Następnie materiał miesza się w zbiorniku fermentacyjnym w celu uzyskania jednorodnej masy fermentacyjnej i prowadzi się fermentację wglębną beztlenową w temperaturze 30 °C do 35 °C przez 72 h do 96 h. Do zakończeniu procesu

10 masę suszy się w temperaturze 50 °C do 55 °C a następnie doprowadzano do temperatury pokojowej. Proces przetwarzania przedstawiony w patencie wpłynął na wzrost zawartości białka ogólnego o 13%, spowodował spadek zawartości cukru ogólnego o 36%, wpłynął na wzrost zawartości fenyloalaniny o 12,5%, treoniny o 8,5%, izoleucyny o 13,6%, leucyny o 12,9%, waliny o 25,4%, proliny o 10,9%, glicyny o 12,8%, alaniny o 16,1%, kwasu

15 asparginowego o 13,3%, kwasu glutaminowego o 11,3%, tyrozyny o 12%, histydyliny o 12,1% i argininy o 10,1%. Ponadto uzyskany materiał charakteryzuje się lepszą smakowitością. Sucha fermentowana mączka z białka kukurydzianego może być stosowana jako źródło wysokiej jakości paszy białkowej.

Z kolei w zgłoszeniu CN1911066 przedstawiono technologie wglębnej fermentacji fasoli za pomocą złożonego enzymu w celu otrzymania białka paszowego, który obejmuje

20 etapy: dodawanie wody o temperaturze 30-45°C, dodanie aktywowanego enzymu i bakterii fermentacji mlekowej (*Bacillus subtilis*) oraz drożdży, lub ich mieszaninę. Fermentacja prowadzona jest w systemie ciągłego mieszania w temperaturze 30-50°C przez 48-84 godziny, do osiągnięcia pH równego 4,5-5,5. W wyniku fermentacji stwierdzono o 90%

25 redukcję inhibitorów tripsyny, wzrost hydrolizy białek o 15%, wzrost zawartości białka ogólnego 8% i kwasu mlekowego o 5%.

W rozwiązaniu znanym ze zgłoszenia CN 106173225 w którym fermentowano białkowy dodatek paszowy skomponowany z mąki pszennej, fasoli, bawełny i cyprysu, za pomocą *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces cerevisiae* i

30 *Lactobacillus*, przy stosunku masowym odpowiednio: 27,8%; 49,7%; 5%; 17,5%, przy czym stężenie bakterii *Bacillus subtilis* wynosiło 1×10^8 cfu/ml, stężenie bakterii kwasu mlekowego w dawce $1,2 \times 10^8$ cfu/ml, stężenie *Saccharomyces cerevisiae* $2,5 \times 10^7$ cfu/ml, stężenie bakterii *Lactobacillus* w wysokości 9×10^7 cfu/ml. W uzyskanym produkcie stwierdzono zawartość polipeptydów > 19%, wzrost zawartości białka ogólnego o 10,02%,

35 zawartość tłuszczu surowego spadła o 35,36%, popiołu surowego o 27,29%.

W rozwiązaniu o numerze CN105941828 proces przewarzania paszy obejmuje odważenie odpowiednio: otrąb kukurydzianych w ilości 70-80%, nasion soi 10-15%, 3-5% wodoro-fosforanu wapnia, chlorku sodu 2- 5%, chlorku magnezu 3%, 0,3-0,5% siarczanu sodu, siarczanu cynku 2%, a następnie całość mieszano w udziale % 60% -70%,

40 30% -40% z wodą i prowadzono fermentację stałą, wglębną z wykorzystaniem szczepu

Aspergillus niger, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* stanowiących 3% - 5% masy w podłożu fermentacyjnym. Warunki procesu: fermentacja tlenowa, w temperaturze 28-35 °C, czas procesu: 2 lub 3 dni. Uzyskana pasza wg wynalazku może być bogatsza w białko o ok. 30-40%, witaminy z grupy B, aminokwasy i 5 inne substancje i może być szeroko stosowana jako białkowy surowiec paszowy w żywieniu zwierząt. Dzięki zastosowaniu tego materiału paszowego skrócony jest okres odchowu, notowana jest lepsza mięsność i produkcja jaj oraz poprawa jakości struktury mięśnia. Ponadto poprawia odporność zwierząt – w szczególności młodych oraz stymulować może wzrost narządów i wpływać na okrywą włosową.

- 10 Z kolei dokument amerykański US20140037786 omawia także sposób wytwarzania fermentowanej paszy dla zwierząt gospodarskich, obejmujący: fermentację w warunkach beztlenowych materiału paszowego zawierającego co najmniej jeden wybrany białkowy materiał roślinny, przy czym zawartość białka w tym materiale wynosi co najmniej 20%;
 15 ponadto w procesie dostarczone ma być źródło fitazy w postaci materiału roślinnego ze zbóż: obejmujących pszenicę, żyto, pszenżyto, jęczmień ozimy i jęczmień jary lub ich kombinację; oraz wprowadzenie inokulantu w postaci bakterii wytwarzających kwas mlekowy (głównie bakterii z rodzaju *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* lub ich kombinacji) w ilości 10^7 cfu/g paszy, zapobiegając rozwojowi jakichkolwiek bakterii, drożdży lub pleśni obecnych w fermentowanych materiałach
 20 paszowych co przyczynia się do ograniczenia patogennych drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym, ale jednocześnie może przyczynić się do obniżenia zawartości substancji antyodżywczych.

W innym patencie znanym z opisu WO 2016046708 przetwarzano przy użyciu nowo wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego. Cel przetwarzania osiąga się 25 stosując substrat pochodzenia roślinnego z kulturę starterową LAB, dominującą przez szczepy *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 lub *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL PI 481 izolowanych z fermentowanego materiału zbożowego. Fermentacja przeprowadzana jest w warunkach beztlenowych lub tlenowych, w temperaturze 20-40 °C, w czasie od 8 h do 72 h w zależności od właściwości podłoża który
 30 został zmieszany z wodą w stosunku 1:1. Po zakończeniu fermentacji zaleca się uzyskany materiał traktować różnorodnie m.in. granulować, suszyć czy konserwować w inny sposób.

Z kolei z badań wykonanych w ostatnich latach wynika, że w dietach drobiu, w szczególności kurcząt rzeźnych można stosować do 7% makuchu rzepakowego bez ujemnych skutków w masie ciała ptaków, wykorzystaniu paszy, wydajności rzeźnej i 35 jakości tuszy. Oznacza to, że w wyprodukowanych ponad 3000 tys. t mieszanek paszowych dla kurcząt rzeźnych może zawierać się około 180–240 t makuchu rzepakowego. Szacunkowa ilość pasz rzepakowych wytwarzanych w Polsce wynosi około 1200– 1400 tys. t rocznie. Plany zwiększenia produkcji biopaliw i korzystne dla rolników ceny nasion rzepaku sprzyjają zwiększaniu jego uprawy. Oznacza to, że konieczne jest

zagospodarowanie wzrastającej ilości makuchów rzepakowych oraz zwiększenie efektywności ich wykorzystania paszowego.

Znane metody w jakich inokulanty, preparaty mikrobiologiczne, enzymatyczne i oraz preparaty chemiczne, w szczególności o działaniu zakwaszającym wprowadzane są do materiału fermentowanego pośrednio mogą wpływać na obniżenie zawartości ANF, mikotoksyn, a także pobudzać aktywność metaboliczną innych dodatków pozostając z nimi w symbiozie. Efektywność procesu fermentacji uzależniona jest od warunków rozwoju mikroorganizmów na który wpływa wilgotność, temperatura, czas, pH, dostęp tlenu i substratów. W praktyce analitycznej zmiany zachodzące podczas przetwarzania pasz często powodowały poprawę części właściwości otrzymanego produktu jak i pogorszenie innych. Oznacza to, że konieczne jest nieustanne optymalizowanie parametrów procesu fermentacji, podłoża i substratów, aby możliwe było jak najszersze pozytywne działanie zmierzające do poprawy wartości pokarmowej pasz, która przyczyni się do możliwości wykorzystania pasz rzepakowych w żywieniu, w szczególności młodszych grup technologicznych i wydajności produkcyjnej, wykorzystania dostępnego materiału i obniżenia kosztów produkcji.

Udało się to poprzez zastosowanie sposobu uszlachetniania makuchów rzepakowych według wynalazku, i jak wykazały testy laboratoryjne osiągnięto wzrost zawartości białka ogólnego, białka strawnego i wartości energetycznej paszy przy jednoczesnym spadku zawartości związków bezazotowych wyciągowych. Ponadto nieoczekiwanie odkryto, że proces fermentacji z udziałem dodatku fitazy wpływa na prawie całkowite zredukowanie zawartości niedostępnego w paszy fosforu w postaci fitynowej oraz blisko dziesięciokrotne zredukowanie koncentracji glukozynolanów, a także pozwala na wykorzystanie w procesie hodowlanym oligosacharydów z rodziny rafinozy (rafinoza i stachioza). Mając na uwadze iż przemysł paszowy poszukuje szybkich, tanich i prostych rozwiązań technologicznych, poprawiających wartości odżywcze makuchu rzepakowego, zaproponowany proces przetwarzania pozwala ponadto obniżyć koszty paszy poprzez zastosowanie w mieszanke zamiast drogiej poekstrakcyjnej śruty sojowej fermentowanych makuchów rzepakowych.

Sposób uszlachetniania makuchów rzepakowych według wynalazku polega na tym, makuch rzepakowy o zawartości białka większej niż 15%, korzystnie w warunkach beztlenowych, poddaje się fermentacji stałej wgłębnej, a do wody z dodatkiem enzymatycznym fitazy, w szczególności płynnej egzogennej 6-fitazy o maksymalnej aktywności 5500 OTU/g dodaje się makuch rzepakowy a po co najmniej 24 h neutralizuje się mikroorganizmy wygrzewając uzyskaną mieszaninę w temperaturze nie mniejszej niż 70 °C przez co najmniej 15 minut, i korzystnie suszy się uzyskany produkt w temperaturze od 45 do 60°C, korzystnie 50-55°C do osiągnięcia co najmniej 86% suchej masy.

Przy czym korzystnie, gdy makuch rzepakowy w ilości 1:2 miesza się z wodą, korzystnie letnią w temperaturze 25-35°C, korzystnie 30 °C i do otrzymanej mieszaniny

aplikuje się enzym w postaci płynnej egzogennej 6-fitazy o maksymalnej aktywności 5500 OTU/g w ilości korzystnie 0,05% do 5% nie mniejszej niż 1% w stosunku do masy mieszaniny makuchu z wodą, a surowce miesza się, co najmniej w momencie dodawania oraz po 6ciu godzinach prowadzenia fermentacji, korzystnie utrzymując temperaturę pokojową lub wyższą, korzystnie temperaturę 30°C przez co najmniej 18h, jednak nie dłużej niż 30h, korzystnie 24h.

Korzystnie, gdy enzym fitazy ma postać płynną lub sypką i pozyskany jest z grzyba *Pichia pastoris*. Korzystnie, gdy w przypadku stosowania enzymu sypkiego, jest on homogenicznie zmieszany z wodą przed dodaniem makuchu, korzystnie w stosunku 1:2 (makuch:woda)

Korzystnie fermentację prowadzi się w naczyniach szklanych, pojemnikach, beczkach lub fermentatorach z tworzywa sztucznego, korzystnie plastiku lub plexi.

Jak pokazały przeprowadzone badania porównawcze w surowym makuchu rzepakowym (materiał wyjściowy) i produktach fermentacji zarówno podczas oznaczenia podstawowego składu chemicznego (białka ogólnego, włókna surowego, tłuszczu surowego, popiołu surowego) wg AOAC (2007), analizy oligosacharydów metodą chromatografii gazowej wg. Zalewski i in. (2001) w PAN w Olsztynie, fosforu fitynowego stosując metodę opisaną przez Haug i Lantzsch (1983), obliczeń statystycznych przy pomocy programu komputerowego SAS 9.3. (USA) oraz SAS Enterprise Guide 5.1 z przyjęciem istotności różnic pomiędzy grupami oraz interakcję pomiędzy nimi obliczono przy użyciu szczegółowego testu t-Studenta (dla porównania w parach) przy $P \leq 0.05$, uzyskany produkt posiada lepsze właściwości fizykochemiczne i skutecznie poprawia wartość odżywczą materiału poprzez wzrost wartości energetycznej paszy i wzrost koncentracji białka ogólnego i białka strawnego przy jednoczesnym obniżeniu bezazotowych związków wyciągowych oraz występujących substancjach antyodżywczych – glukozyzolanów, fosforu fitynowego, oligosacharydów. Wyniki przeprowadzonych testów obrazują tabele.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w podstawowym składzie chemicznym materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego. (Średnie wyniki z 4 powtórzeń fermentacji)

Składniki (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
popiół surowy	6.700	6.702	0.100	0.9000
białko ogólne	32.511b	34.855a	0.620	<0.0001
białko strawne	26.801b	29.569a	0.570	<0.0001
włókno surowe	15.517	16.384	0.260	0.0500
tłuszcz surowy	9.956a	9.287b	0.120	<0.0001
ZBW	35.315a	32.773b	1.010	<0.0001

EB(kcal)	5126.59b	5240.29a	23.880	0.0021
EB (MJ)	21.454b	21.937a	0.100	0.0019
Składniki mineralne				
Fosfor ogólny	1.151	1.143	0.010	0.0803

Tabela 1. Podstawowy skład chemiczny materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Stwierdzono, istotne zmiany w składzie chemicznym. Proces fermentacji istotnie wpływa na wzrost zawartości białka ogólnego, białka strawnego i wartości energii brutto paszy przy jednoczesnym spadku zawartości związków bezazotowych wyciągowych, bez wpływu na zawartość pozostałych składników.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości fosforu fitynowego i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Składnik (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
P fit	0.307a	0.016b	0.030	<.0001
P fit % Pog.	26.67a	1.40b	2.913	<.0001

Tabela 2. Zawartość fosforu fitynowego (P) i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Fermentacja makuchu rzepakowego prawie całkowicie zredukowała poziom niedostępnego w paszy fosforu w postaci fitynowej

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości glukozynolanów materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Komponent (μmol/g)	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy
Glukozynolany (μmol/g)	16.30	1.66
glukonapina	3.09	0.29
glukobrassicinapina	1.20	0.10
progoitryna	8.89	0.54

glukobrassicyna	0.17	0.00
hydroksyglukobrassicyna	2.95	0.74

Tabela 3 . Zawartość glukozynolanów w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i w suchym fermentowanym makuchu rzepakowego.

Fermentacja makuchu rzepakowego blisko dziesięciokrotnie zredukowała zawartość w nim wszystkich glukozynolanów (glukonapinę, glukobrassicinapinę, progoitrynę, 5 glukobrassicynę, hydroksyglukobrassicynę)

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

	mg g-1 suchej masy		Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	cukrowce		średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
1	fruktoza		0.30	0.03	0.02	0.35	0.01	0.01
2	galaktoza		0.00	0.00	0.00	0.19	0.01	0.01
3	glukoza		0.83	0.02	0.01	0.35	0.04	0.02
4	sacharoza		53.16	0.65	0.38	2.73	0.08	0.04
5	maltoza		0.57	0.08	0.05	0.09	0.00	0.00
6	galaktinol		1.21	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00
7	DGMI		0.09	0.01	0.00	0.08	0.00	0.00
8	rafinoza	Cukry z rodziny rafinozy	3.21	0.06	0.03	1.47	0.07	0,04
9	stachioza		17.66	0.44	0.25	0.48	0.03	0,01
10	1-KESTOZA/melecytoza		0.54	0.07	0.04	0.58	0.05	0.03
11	di-galaktozylo-glicerol		0.56	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
	suma		78.14	0.71	0.41	6.31	0.82	0.47

10 Tabela 4. Zawartość cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Stwierdzono korzystne zmiany w zawartości cukrowców, wykorzystanie sacharozy, rozkład oligosacharydów (rafinozy i stachiozy) należących do substancji antyodżywczych przy jednoczesnym wzroście poziomu monosacharydów.

15

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości mannitolu i uaktywnienia mio-inozytolu w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowym) i w suchym fermentowanym materiale.

mg g-1 suchej masy		Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	Cukrowce	średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
1	Mannitol	0.21	0.01	0.01	8.11	0.58	0.33
2	mio-inozytol	0.49	0.02	0.01	2.54	0.09	0.05

Tabela 5. Zawartość mannitolu i mio-inozytolu w materiale wyjściowym i suchym fermentowanym makuchu rzepakowym

Wytworzony w procesie mannitol (wzrost prawie czterdziestokrotny) pozwala wydłużyć trwałość uzyskanego produktu. ponadto ma on właściwości nawilżające i 5 bakteriostatyczne. Z kolei mio-inozytol (wzrost ponad pięciokrotny) w produkcie fermentowanym powszechnie zaliczany do witamin z grupy B jest składnikiem fosfolipidów, błon komórkowych, odgrywa istotną rolę w morfo- i cytogenezie komórkowej, a także w syntezie lipidów.

Wytworzony fermentowany makuch rzepakowy może zostać wykorzystany do 10 produkcji mieszanek pełnoporcjowych, pasz uzupełniających, koncentratów i innych mieszanek paszowych stosowanych w żywieniu zwierząt.

Przykład zastosowania

Przykład I

Sposób uszlachetniania makuchów rzepakowych według wynalazku polega na tym, 15 makuch rzepakowy o zawartości białka większej niż 22%, w warunkach beztlenowych poddaje się fermentacji stałej wgłębnej, a do wody z dodatkiem enzymatycznym fitazy, w postaci płynnej egzogennej 6-fitazy o aktywności 5000 OTU/g, w ilości 1% do masy mieszaniny wody i makuchu, a po 24 h neutralizuje się mikroorganizmy wygrzewając uzyskaną mieszaninę w temperaturze 70°C przez 15 minut, suszy się uzyskany produkt w 20 temperaturze 50-55°C do osiągnięcia 86% suchej masy.

Przy czym makuch rzepakowy w ilości 1:2 miesza się z letnią wodą o temperaturze około 30°C wymieszanej z enzymem w postaci egzogennej 6-fitazy o aktywności 5000 OTU/g w ilości 1% w stosunku do masy mieszaniny makuchu z wodą, a surowce miesza się w momencie dodawania oraz po 6ciu godzinach prowadzenia fermentacji, utrzymując 25 temperaturę pokojową 30°C przez cały proces fermentacji.

Enzym fitazy ma postać płynną i wytworzony jest z grzyba *Pichia pastoris*, a enzym homogenicznie zmieszany jest z mieszaniną wody i makuchu w stosunku 2:1

Fermentację prowadzi się w naczyniach wybranych spośród naczyń szklanych, pojemników, beczek lub fermentatorów z tworzywa sztucznego.

30 Jak pokazały przeprowadzone badania porównawcze w surowym makuchu rzepakowym (materiał wyjściowy) i produktach fermentacji zarówno podczas oznaczenia podstawowego składu chemicznego (białka ogólnego, włókna surowego, tłuszczu surowego, popiołu surowego) wg AOAC (2007), analizy oligosacharydów metodą chromatografii gazowej wg. Zalewski i in. (2001) w PAN w Olsztynie, fosforu fitynowego 35 stosując metodę opisaną przez Haug i Lantzsch (1983), obliczeń statystycznych przy pomocy programu komputerowego SAS 9.3. (USA) oraz SAS Enterprise Guide 5.1 z przyjęciem istotności różnic pomiędzy grupami oraz interakcję pomiędzy nimi obliczono przy użyciu szczegółowego testu t-Studenta (dla porównania w parach) przy $P \leq 0.05$,

uzyskany produkt posiada lepsze właściwości wartości energetycznej paszy i wzrost koncentracji białka ogólnego i białka strawnego przy jednoczesnym obniżeniu bezazotowych związków wyciągowych oraz występujących substancjach antyodżywczych – glukozynolanów, fosforu fitynowego, oligosacharydów. Wyniki przeprowadzonych 5 testów obrazują tabele.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w podstawowym składzie chemicznym materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego. (Średnie wyniki z 4 powtórzeń fermentacji)

Składniki (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
popiół surowy	6.700	6.702	0.100	0.9000
białko ogólne	32.511b	34.855a	0.620	<0.0001
białko strawne	26.801b	29.569a	0.570	<0.0001
włókno surowe	15.517	16.384	0.260	0.0500
tluszcz surowy	9.956a	9.287b	0.120	<0.0001
ZBW	35.315a	32.773b	1.010	<0.0001
EB(kcal)	5126.59b	5240.29a	23.880	0.0021
EB (MJ)	21.454b	21.937a	0.100	0.0019
Składniki mineralne				
P	1.151	1.143	0.010	0.0803

10 Tabela 6. Podstawowy skład chemiczny materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Stwierdzono, istotne zmiany w składzie chemicznym. Proces fermentacji istotnie wpływa na wzrost zawartości białka ogólnego, białka strawnego i wartości energii brutto paszy 15 przy jednoczesnym spadku zawartości związków bezazotowych wyciągowych, bez wpływu na zawartość pozostałych składników.

20 ***Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości fosforu fitynowego i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.***

Składnik (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
P fit	0.307a	0.016b	0.030	<.0001
P fit % P og.	26.67a	1.40b	2.913	<.0001

Tabela 7. Zawartość fosforu fitynowego i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Fermentacja makuchu rzepakowego prawie całkowicie zredukowała poziom niedostępnego w paszy fosforu w postaci fitynowej

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości glukozynolanów materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Komponent (μmol/g)	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy
Glukozynolany (μmol/g)	16.30	1.66
glukonapina	3.09	0.29
glukobrassicinapina	1.20	0.10
progoitryna	8.89	0.54
glukobrassicyna	0.17	0.00
hydroksyglukobrassicyna	2.95	0.74

Tabela 8. Zawartość glukozynolanów w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i w suchym fermentowanym makuchu rzepakowego.

Fermentacja makuchu rzepakowego blisko dziesięciokrotnie zredukowała zawartość w nim wszystkich glukozynolanów (glukonapinę, glukobrassicinapinę, progoitrynę, glukobrassicynę, hydroksyglukobrassicynę)

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

	mg g-1 suchej masy		Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	cukrowce		średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
1	fruktoza		0.30	0.03	0.02	0.35	0.01	0.01
2	galaktoza		0.00	0.00	0.00	0.19	0.01	0.01
3	glukoza		0.83	0.02	0.01	0.35	0.04	0.02
4	sacharoza		53.16	0.65	0.38	2.73	0.08	0.04
5	maltoza		0.57	0.08	0.05	0.09	0.00	0.00
6	galaktinol		1.21	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00
7	DGMI		0.09	0.01	0.00	0.08	0.00	0.00
8	rafinoza	Cukry z rodziny rafinozy	3.21	0.06	0.03	1.47	0.07	0,04
9	stachioza		17.66	0.44	0.25	0.48	0.03	0,01
10	1-KESTOZA/melecytoza		0.54	0.07	0.04	0.58	0.05	0.03
11	di-galaktozylo-glicerol		0.56	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
	suma		78.14	0.71	0.41	6.31	0.82	0.47

Tabela 9. Zawartość cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Stwierdzono korzystne zmiany w zawartości cukrowców, wykorzystanie sacharozy, 5 rozkład oligosacharydów (rafinozy i stachiozy) należących do substancji antyodżywczych przy jednoczesnym wzroście poziomu monosacharydów.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości mannitolu i uaktywnienia mio-inozytolu w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowym) i w suchym fermentowanym materiale.

mg g-l suchej masy		Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	Cukrowce	średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
4	Mannitol	0.21	0.01	0.01	8.11	0.58	0.33
7	mio-inozytol	0.49	0.02	0.01	2.54	0.09	0.05

10 *Tabela 10. Zawartość mannitolu i mio-inozytolu w materiale wyjściowym i suchym fermentowanym makuchu rzepakowym*

Wytworzony w procesie mannitol (wzrost prawie czterdziestokrotny) pozwala wydłużyć trwałość uzyskanego produktu. ponadto ma on właściwości nawilżające i 15 bakteriostatyczne. Z kolei mio-inozytol (wzrost ponad pięciokrotny) w produkcie fermentowanym powszechnie zaliczany do witamin z grupy B jest składnikiem fosfolipidów, błon komórkowych, odgrywa istotną rolę w morfo- i cytogenezie komórkowej, a także w syntezie lipidów.

Wytworzony fermentowany makuch rzepakowy może zostać wykorzystany do 20 produkcji mieszanek pełnoporcjowych, pasz uzupełniających, koncentratów i innych mieszanek paszowych stosowanych w żywieniu zwierząt.

Przykład II

Sposób uszlachetniania makuchów rzepakowych według wynalazku polega na tym, makuch rzepakowy o zawartości białka większej niż 18%, w warunkach beztlenowych 25 poddaje się fermentacji wgłębnej, a do wody dodaje się dodatek enzymatyczny fitazy, w postaci egzogennej 6-fitazy o aktywności 1250 OTU/g, a następnie makuch rzepakowy, a po 24 h neutralizuje się mikroorganizmy wygrzewając uzyskaną mieszaninę w temperaturze 70 °C przez 15 minut i suszy się uzyskany produkt w temperaturze 50-55°C do osiągnięcia 86% suchej masy.

30 Przy czym makuch rzepakowy w ilości 1:2 miesza się z letnią wodą o temperaturze około 30°C się zawierającej dodatek enzymatyczny w postaci egzogennej 6-fitazy o aktywności 1250 OTU/g w ilości 1% w stosunku do masy mieszaniny makuchu z wodą, a surowce miesza się w momencie dodawania oraz po 6ciu godzinach prowadzenia fermentacji, utrzymując temperaturę pokojową 30°C przez cały proces fermentacji.

Enzym fitazy ma postać sypką i wytworzony jest z grzyba *Pichia pastoris* i miesza się go z wodą przed dodaniem makucha rzepakowego w stosunku

Fermentację prowadzi się w naczyniach wybranych spośród naczyń szklanych, pojemników, beczek lub fermentatorów z tworzywa sztucznego.

5 Jak pokazały przeprowadzone badania porównawcze w surowym makuchu rzepakowym (materiał wyjściowy) i produktach fermentacji zarówno podczas oznaczenia podstawowego składu chemicznego (białka ogólnego, włókna surowego, tłuszczu surowego, popiołu surowego) wg AOAC (2007), analizy oligosacharydów metodą chromatografii gazowej wg. Zalewski i in. (2001) w PAN w Olsztynie, fosforu fitynowego
10 stosując metodę opisaną przez Haug i Lantzsch (1983), obliczeń statystycznych przy pomocy programu komputerowego SAS 9.3. (USA) oraz SAS Enterprise Guide 5.1 z przyjęciem istotności różnic pomiędzy grupami oraz interakcję pomiędzy nimi obliczono przy użyciu szczegółowego testu t-Studenta (dla porównania w parach) przy $P \leq 0.05$, uzyskany produkt posiada lepsze właściwości fizykochemiczne i skutecznie poprawia
15 wartość odżywczą materiału poprzez wzrost zawartości białka ogólnego i tłuszczu surowego przy jednoczesnym obniżeniu włókna surowego oraz występujących substancjach antyodżywczych – glukozynolanów, fosforu fitynowego, oligosacharydów. Wyniki przeprowadzonych testów obrazują tabele.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w podstawowym składzie chemicznym materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego. (Średnie wyniki z 4 powtórzeń fermentacji)

Składniki (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
popiół surowy	6.700	6.702	0.100	0.9000
białko ogólne	32.511b	34.855a	0.620	<0.0001
białko strawne	26.801b	29.569a	0.570	<0.0001
włókno surowe	15.517	16.384	0.260	0.0500
tłuszcz surowy	9.956a	9.287b	0.120	<0.0001
ZBW	35.315a	32.773b	1.010	<0.0001
EB(kcal)	5126.59b	5240.29a	23.880	0.0021
EB (MJ)	21.454b	21.937a	0.100	0.0019
Składniki mineralne				
P	1.151	1.143	0.010	0.0803

Tabela 11. Podstawowy skład chemiczny materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

25

Stwierdzono, istotne zmiany w składzie chemicznym. Proces fermentacji istotnie wpływa na wzrost zawartości białka ogólnego, białka strawnego i wartości energii brutto paszy

przy jednoczesnym spadku zawartości związków bezazotowych wyciągowych, bez wpływu na zawartość pozostałych składników.

- 5 ***Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości fosforu fitynowego i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.***

Składnik (%) w suchej masie	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy	SEM	P
P fit	0.307a	0.016b	0.030	<.0001
P fit % Pog.	26.67a	1.40b	2.913	<.0001

10 *Tabela 12. Zawartość fosforu fitynowego i % stosunku udziału fosforu fitynowego do fosforu ogólnego materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.*

Fermentacja makuchu rzepakowego prawie całkowicie zredukowała poziom niedostępnego w paszy fosforu w postaci fitynowej

- 15 ***Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości glukozynolanów materiału wyjściowego (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.***

Komponent (μmol/g)	Surowy makuch rzepakowy	Fermentowany makuch rzepakowy
Glukozynolany (μmol/g)	16.30	1.66
glukonapina	3.09	0.29
glukobrassicinapina	1.20	0.10
progoitryna	8.89	0.54
glukobrassicyna	0.17	0.00
hydroksyglukobrassicyna	2.95	0.74

20 *Tabela 13. Zawartość glukozynolanów w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i w suchym fermentowanym makuchu rzepakowego.*

Fermentacja makuchu rzepakowego blisko dziesięciokrotnie zredukowała zawartość w nim wszystkich glukozynolanów (glukonapinę, glukobrassicinapinę, progoitrynę, glukobrassicynę, hydroksyglukobrassicynę)

- 25 ***Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.***

	mg g-1 suchej masy	Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	<i>cukrowce</i>	średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
1	fruktoza	0.30	0.03	0.02	0.35	0.01	0.01
2	galaktoza	0.00	0.00	0.00	0.19	0.01	0.01
3	glukoza	0.83	0.02	0.01	0.35	0.04	0.02
4	sacharoza	53.16	0.65	0.38	2.73	0.08	0.04
5	maltoza	0.57	0.08	0.05	0.09	0.00	0.00
6	galaktinol	1.21	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00
7	DGMI	0.09	0.01	0.00	0.08	0.00	0.00
8	rafinoza	Cukry z rodziny rafinozy	3.21	0.06	0.03	1.47	0.07
9	stachioza		17.66	0.44	0.25	0.48	0.03
10	1-KESTOZA/melecycytoza	0.54	0.07	0.04	0.58	0.05	0.03
11	di-galaktozylo-glicerol	0.56	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
	suma	78.14	0.71	0.41	6.31	0.82	0.47

Tabela 14 . Zawartość cukrowców w tym oligosacharydów z rodziny rafinozy w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowego) i suchego fermentowanego makuchu rzepakowego.

Stwierdzono korzystne zmiany w zawartości cukrowców, wykorzystanie sacharozy, 5 rozkład oligosacharydów (rafinozy i stachiozy) należących do substancji antyodżywczych przy jednoczesnym wzroście poziomu monosacharydów.

Określenie wpływu procesu fermentacji na zmiany w zawartości mannitolu i uaktywnienia mio-inozytolu w materiale wyjściowym (makuchu rzepakowym) i w 10 suchym fermentowanym materiale.

	mg g-1 suchej masy	Surowy makuch rzepakowy			Fermentowany makuch rzepakowy		
Lp.	<i>Cukrowce</i>	średnia	SD	SEM	średnia	SD	SEM
1	mannitol	0.21	0.01	0.01	8.11	0.58	0.33
2	mio-inozytol	0.49	0.02	0.01	2.54	0.09	0.05

Tabela 15. Zawartość mannitolu i mio-inozytolu w materiale wyjściowym i suchym fermentowanym makuchu rzepakowym

Wytworzony w procesie mannitol (wzrost prawie czterdziestokrotny) pozwala 15 wydłużyć trwałość uzyskanego produktu. ponadto ma on właściwości nawilżające i bakteriostatyczne. Z kolei mio-inozytol (wzrost ponad pięciokrotny) w produkcie fermentowanym powszechnie zaliczany do witamin z grupy B jest składnikiem fosfolipidów, błon komórkowych, odgrywa istotną rolę w morfo- i cytogenezie komórkowej, a także w syntezie lipidów.

20 Wytworzony fermentowany makuch rzepakowy może zostać wykorzystany do produkcji mieszanek pełnoporcjowych, pasz uzupełniających, koncentratów i innych mieszanek paszowych stosowanych w żywieniu zwierząt.