

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201790311** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2017.08.31

(51) Int. Cl. *A23K 3/03* (2006.01)  
*A23K 1/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2015.08.27

---

(54) **УЛУЧШЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ГЕТЕРО- И ГОМОФЕРМЕНТАТИВНЫХ ВИДОВ  
МОЛОЧНО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ СИЛОСА С  
ДВОЙНЫМ ЭФФЕКТОМ**

---

(31) 14182628.9; 14188993.1; PA 2014 00652;  
62/156,999

(32) 2014.08.28; 2014.10.15; 2014.11.10;  
2015.05.05

(33) EP; EP; DK; US

(86) PCT/EP2015/069627

(87) WO 2016/030456 2016.03.03

(71) Заявитель:  
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:  
Хиндриксен Ида, Милора Нина (DK),  
Ольссон Кристер (SE)

(74) Представитель:  
Поликарпов А.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к силосному инокулянту, состоящему, по существу, из а) по меньшей мере одного вида или штамма облигатных гетероферментативных молочно-кислых бактерий и б) по меньшей мере одного вида или штамма гомоферментативных бактерий, который (1) не уменьшает рост (а) и (2) быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты. Кроме того, изобретение относится к способу получения ферментированного кормового продукта, где указанный способ включает инокулирование растительного материала силосным инокулянтом по настоящему изобретению. Неожиданно было обнаружено, что этот силосный инокулянт является эффективным, даже если силос инкубировали только в течение периода вплоть до 2 или вплоть до 4 суток.

**A1**

**201790311**

**201790311**

**A1**

## **УЛУЧШЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ГЕТЕРО- И ГОМОФЕРМЕНТАТИВНЫХ ВИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ СИЛОСА С ДВОЙНЫМ ЭФФЕКТОМ**

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем изобретении предложены улучшенные композиции бактериальных инокулянтов, полезные, например, для получения и консервирования силоса. В определенных воплощениях композиции включают облигатный гетероферментативный вид (или его штамм), такой как *Lactobacillus* sp., и гомоферментативный вид (или его штамм), такой как *Lactococcus* sp. или *Enterococcus* sp. (или их штамм). Эти композиции полезны для получения ферментированного кормового продукта, такого как силос. Таким образом, в изобретении также предложены способы, включающие инокулирование растительного материала композициями бактериальных инокулянтов, раскрытых в данном описании. В некоторых воплощениях инокулированный материал является подходящим для применения после короткого периода инкубирования, такого как период инкубирования в 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 суток.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Силос представляет собой ферментированный растительный продукт, который можно использовать для кормления жвачных животных. Силос можно изготавливать из различных растительных материалов, которые хранят в анаэробных условиях для активирования анаэробной ферментации. Бактериальные инокулянты можно добавлять для активирования процесса ферментирования и/или улучшения силосного продукта. Силос консервируют путем установления анаэробных условий и путем быстрого снижения pH, ассоциированного с продуцированием органической кислоты природными бактериями или инокулированными молочнокислыми бактериями. Низкий pH ингибирует рост многих штаммов, вызывающих порчу, которые в противном случае могут приводить к потере большого количества питательных веществ.

Когда силос подвергается действию воздуха, например, когда силосный бункер, силосохранилище, кучу или рулон открывают с целью доступа к силосу для его использования, аэробные условия могут приводить к росту любых

присутствующих в силосе аэробных штаммов, вызывающих порчу. Рост аэробных вызывающих порчу штаммов приводит к повышению температуры и большой потере питательных веществ.

Таким образом, как порча в начале процесса ферментирования, так и аэробная порча при отборе корма представляют собой источники значительных экономических потерь для фермеров.

Первое поколение бактериальных силосных инокулянтов включало облигатные гомоферментативные (например *L. acidophilus*, *L. salivarius*) и факультативные гетероферментативные (например *L. plantarum*) бактериальные виды, предназначенные для быстрого снижения pH для предупреждения роста вызывающих порчу штаммов, естественным образом присутствующих в растительном материале, таких как грамотрицательные *Enterobacteraceae* (например *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Shigella*) или грамположительные *Clostridia* (*C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*). Предотвращение роста вызывающих порчу штаммов путем быстрого снижения pH уменьшало потери питательных веществ и часто в некоторой степени улучшало аэробную стабильность (Jatkauskas *et al.* (2013), Jatkauskas и Vrotniakiene (2013)).

Второе поколение бактериальных силосных инокулянтов фокусировалось на *L. buchneri*, облигатном гетероферментативном виде, который, как было обнаружено, является превосходным в плане предупреждения аэробной порчи аэробными вызывающими порчу видами при выемке корма, когда силосный бункер/куча подвергаются воздействию воздуха. Однако недостаток использования *L. buchneri* в качестве бактериального силосного инокулянта состоит в том, что он имеет более продолжительную лаг-фазу по сравнению с другими видами и на ранней стадии ферментирования продуцирование им уксусной кислоты и молочной кислоты не приводит к быстрому снижению pH по сравнению с облигатными гомоферментативными или факультативными гетероферментативными видами.

На Фиг. 1 из Jatkauskas и Vrotniakiene (2013) показано, что только *L. buchneri* (P0) является лучшим по сравнению с другими протестированными продуктами в отношении аэробной стабильности, то есть времени, которое требуется для того, чтобы вызывающие порчу аэробные штаммы нагрели

силосный бункер при повторном подвергании воздействию воздуха. Второй наилучший продукт для поддержания низкой температуры в течение многих часов представлял собой облигатный гетероферментативный/факультативный гетероферментативный/ гомоферментативный комбинированный продукт, содержащий *L. buchneri*, *L. plantarum*, *E. faecium*, (P1), и следующими наилучшими продуктами были исключительно факультативные гетероферментативные/гомоферментативные продукты, содержащие *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis* с бензоатом натрия (P2a) или без него (P2b), факультативный гетероферментативный/гомоферментативный продукт, содержащий *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis*, (P3), и факультативный гетероферментативный продукт, содержащий два штамма *L. plantarum*, (P4). (Силос, который не был инокулирован, имел самую низкую аэробную стабильность.)

Таким образом, сохраняется потребность в улучшенных композициях бактериальных силосных инокулянтов.

#### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Предложены улучшенные композиции бактериальных инокулянтов, полезных, например, для получения и консервирования силоса. Также предложены способы, включающие инокулирование растительного материала композициями бактериальных инокулянтов, раскрытыми в данном описании.

В некоторых воплощениях предложены силосные инокулянты, состоящие по существу из (а) по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий (или их штамма) и (б) по меньшей мере одного вида гомоферментативных бактерий (или их штамма), который (1) не уменьшает рост по меньшей мере одного вида или штамма облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий (а) и (2) быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты. В некоторых воплощениях по меньшей мере один вид облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий (или их штамм) представляет собой *Leuconostoc* sp. или *Lactobacillus* sp., выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus reuteri* (или их штамма). В некоторых воплощениях вид облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий (или их штамм) представляет

собой *Lactobacillus buchneri*, депонированный как DSM 22501. В некоторых воплощениях по меньшей мере один вид или штамм гомоферментативных бактерий представляет собой *Enterococcus*, например *Enterococcus faecium*. В некоторых воплощениях по меньшей мере один вид или штамм гомоферментативных бактерий представляет собой *Lactococcus*, такой как *Lactococcus lactis*, такой как штамм, депонированный как DSM 11037. В конкретных воплощениях силосные инокулянты состоят по существу из *Lactobacillus buchneri* и *Lactococcus*.

В некоторых воплощениях предложены способы получения ферментированного кормового продукта, включающие инокулирование растительного материала силосным инокулянтом, как раскрыто в данном описании. В некоторых воплощениях растительный материал инкубируют с силосным инокулянтом в течение периода вплоть до 2 суток, или вплоть до 4 суток, или вплоть до 7 суток, или вплоть до 8 суток, или вплоть до 14 суток, или вплоть до 28 суток, или по меньшей мере 90 суток.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Как отмечено выше, в настоящем изобретении предложены улучшенные композиции бактериальных инокулянтов, например, для получения и консервирования силоса. В определенных воплощениях композиции содержат облигатный гетероферментативный вид (или его штамм), такой как *Lactobacillus* sp., и гомоферментативный вид (или его штамм), такой как *Lactococcus* sp. или *Enterococcus* sp. Композиции являются полезными в получении ферментированного кормового продукта, такого как силос. Таким образом, также предложены способы, включающие инокулирование растительного материала композициями бактериальных инокулянтов, раскрытых в данном описании. В некоторых воплощениях инокулированный материал является подходящим для использования после короткого периода инкубирования.

#### *Определения*

Применение терминов в единственном числе в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей далее формулы изобретения) следует понимать как охватывающее и единственное и множественное число, если здесь не указано иное или это очевидно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий" и "включающий"

следует понимать как неограничивающие термины (то есть как обозначающие "включающий, но не ограниченный этим,") если не указано иное. Перечисление диапазонов величин здесь предназначено служить только как сокращенный способ ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, попадающую в этот диапазон, если в описании не указано иное, и каждая отдельная величина включена в данное описание как если бы она была отдельно указана в описании. Все стадии способов, раскрытых в описании, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное или это очевидно не противоречит контексту. Применение любого или всех примеров или иллюстративного языка (например, "такой как"), предложенных в описании, предназначено только для того, чтобы лучше осветить данное изобретение и не накладывает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Никакое выражение в данном описании не следует понимать как указывающее на какой-либо не заявленный элемент как существенный для осуществления изобретения.

Молочнокислые бактерии включают такие рода как *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* и *Lactobacillus spp.* Их можно разделить на три подгруппы: облигатные гетероферментативные, факультативные гетероферментативные и гомоферментативные. Молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* могут быть либо факультативными гетероферментативными, либо гомоферментативными в зависимости от вида (Vandamme et al., 1996).

Облигатные гетероферментативные молочнокислые бактерии ферментируют гексозы в молочную кислоту, уксусную кислоту, этанол и углекислый газ посредством фосфоглюконатного пути. Примерами видов облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий являются *Leuconostoc* и *Lactobacillus*, такие как *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*.

Факультативные гетероферментативные молочнокислые бактерии дополнительно могут ферментировать пентозы в молочную кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и этанол, когда количество глюкозы ограничено. Примерами факультативных гетероферментативных молочнокислых бактерий являются *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*,

*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии определяют как бактерии, которые разлагают главным образом гексозы посредством пути Эмбдена-Мейергофа в молочную кислоту. Примерами гомоферментативных молочнокислых бактерий являются *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.* и *Lactobacillus*, такие как *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*.

Многие продукты на рынке комбинируют факультативные гетероферментативные/гомоферментативные виды с высокой продукцией молочной кислоты с *L. buchneri*. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что эта комбинация бактерий не позволяет достичь наилучшей возможной аэробной стабильности (то есть не способствуют поддержанию температуры окружающей среды при выемке корма). Не желая быть связанными теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что эта комбинация бактерий уменьшает рост *L. buchneri* и/или продуцирует большие количества молочной кислоты, которую могут потреблять аэробные вызывающие порчу штаммы, вследствие чего начинается порча силоса под воздействием воздуха. В соответствии с некоторыми воплощениями инокулянты, раскрытые в данном описании, решают эту проблему путем комбинирования облигатных гетероферментативных видов (например *L. buchneri*) с видами бактерий, которые быстро снижают pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты (например *Lactococcus* и *Enterococcus*). Такие выбранные гомоферментативные виды не препятствуют положительному действию облигатных гетероферментативных видов или по меньшей мере только в значительно меньшей степени препятствуют ему.

Таким образом, в некоторых воплощениях настоящего изобретения предложен силосный инокулянт, состоящий по существу из по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и по меньшей мере одного вида гомоферментативных бактерий, который предпочтительно не уменьшает рост этого вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий, и который предпочтительно быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты.

Под выражением “состоящий по существу из” понимают, что силосный инокулянт содержит только определенные бактерии в качестве активных компонентов и не содержит другого(других) активного(активных) компонента(ов), такого(таких) как какие-либо другие бактерии, ферменты, органические кислоты, бензоат натрия, нитрат натрия или гексамин. Инокулянт, как раскрыто в данном описании, который состоит по существу из определенных бактерий, не включает *Lactobacillus plantarum*.

Под выражением “по меньшей мере один” понимают, что композиция инокулянта может содержать один, два, три, четыре, пять или даже больше разных видов облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и один, два, три, четыре, пять или даже больше разных видов гомоферментативных бактерий.

В определенных воплощениях вид или штамм гомоферментативных бактерий не уменьшает рост вида или штамма облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий. Это свойство можно протестировать путем выращивания штаммов гомоферментативных бактерий и штаммов облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий в течение ночи в среде Ман-Рогоза-Шарп (MRS) при 37°C, делая посев штрихом как видов или штаммов гомоферментативных бактерий, так и видов или штаммов облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий, которые подлежат тестированию, на одну и ту же чашку с агаром MRS и по существу в одно и то же время, а затем инкубируя чашку с агаром в анаэробных условиях при 37°C в течение ночи. Если рост облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий ингибирован по меньшей мере на 5 мм, значит тестируемый гомоферментативный вид или штамм не обладает этим желаемым свойством. Если силосный инокулянт включает более чем один вид или штамм облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий или более чем один вид или штамм гомоферментативных бактерий, могут быть протестированы все релевантные комбинации.

Путем такого тестирования было обнаружено, что низин-продуцирующие штаммы гомоферментативного вида *Lactobacillus lactis*, такие как *L. lactis* NCIMB 30117 и *L. lactis* ATCC 11454, ингибировали *L. buchneri* DSM 22501, в то время

как штаммы *L. lactis* DSM 11037 и *E. faecium* DSM 16656, которые не продуцируют низин, не ингибируют *L. buchneri* DSM 22501.

Не будучи связанными теорией, эти результаты свидетельствуют о том, что только низин-продуцирующие гомоферментативные штаммы вида *Lactobacillus lactis* ингибируют облигатный гетероферментативный вид или штамм, и что бактериоцин-продуцирующие гомоферментативные виды или штаммы, которые не продуцируют низин, не ингибируют облигатный гетероферментативный вид или штамм. Соответственно, требование о том, чтобы по меньшей мере один вид или штамм гомоферментативных бактерий не уменьшал рост по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий, может быть выполнено, если этот вид или штамм гомоферментативных бактерий не продуцирует низин. Таким образом, в определенных воплощениях гомоферментативный вид или штамм представляет собой бактериоцин-продуцирующий гомоферментативный вид или штамм, который не продуцирует низин, хотя прямым скринингом, как подчеркнуто выше, можно идентифицировать другие штаммы, которые проявляют это свойство. В определенных воплощениях изобретение относится к силосному инокулянту, состоящему по существу из по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий (или их штамма) и по меньшей мере одного вида гомоферментативных бактерий (или их штамма), который (1) не продуцирует низин и (2) быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты.

В определенных воплощениях вид или штамм гомоферментативных бактерий быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты. Как отмечено выше, быстрое снижение pH может ингибировать порчу на ранних стадиях производства силоса путем ингибирования роста вызывающих порчу микроорганизмов, таких как *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, дрожжи и плесени. Вызывающие порчу микроорганизмы могут приводить к потере питательных веществ, росту патогенных микроорганизмов и посторонним привкусам, которые делают силос менее приятным для животных, таких как жвачные животные, для которых он служит кормом.

При использовании в данном описании, "вид или штамм, который быстро

снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты” определен как вид или штамм, который продуцирует не более чем 3 мг/мл молочной кислоты после 24-часового инокулирования на водяной бане при 30°C пробирки, содержащей 150000 КОЕ (колониеобразующие единицы)/мл штамма в 10 мл стерильной силосной среды, полученной посредством смешивания 5 г/л дрожжевого экстракта (Oxoid L21), 5 г/л нейтрализованного соевого пептона (Oxoid LP0044C), 0,8 г/л растворимого крахмала (Merck 1252), 0,08 г/л дигидрата сульфата марганца (II) (Sigma M-1114), 0,037 г/л янтарной кислоты (assay lab), 0,069 г/л моногидрата лимонной кислоты и 0,14 L-яблочной кислоты (Merck 244) в 900 мл воды Milli Q до растворения, подводя pH до 6,3, разливания в миникультуральные флаконы и автоклавирования при 121°C в течение 15 минут, и затем добавления 100 мл стерильного профильтрованного сахарного раствора, содержащего 56 г/л D(-)-фруктозы (Merck 4007), 32 г/л моногидрата D(+)-глюкозы (Merck 8342), 20 г/л D(+)-ксилозы (Merck 8689), 20 г/л L(+)-арабинозы (Aldrich A9, 190-6) и 32 г/л сахарозы (Merck 7651).

Согласно одному воплощению силосный инокулянт включает по меньшей мере один вид или штамм облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий, который представляет собой вид *Leuconostoc* или *Lactobacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus reuteri*. В определенном воплощении вид или штамм облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий представляет собой *Lactobacillus buchneri*. Примерами *Lactobacillus buchneri*, которые рассматриваются как полезные в настоящем изобретении, являются *L. buchneri* KKP .907, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* NCIMB 40788, *L. buchneri* NCIMB 30139, *L. buchneri* DSM 16774, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* DSM 12856. В определенных воплощениях *Lactobacillus buchneri* представляет собой штамм *Lactobacillus buchneri*, депонированный как DSM 22501.

В некоторых воплощениях силосный инокулянт включает по меньшей мере один вид или штамм бактерий, который быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты, который представляет собой *Enterococcus*, такой как *Enterococcus faecium*. Примеры *Enterococci*, которые рассматриваются как полезные в настоящем изобретении, представляют собой *E. faecium* NCIMB 10415, *E. faecium* CNCM I-3236, *E.*

*faecium* BIO 34 и *E. faecium* DSM 16573.

В других воплощениях силосный инокулянт включает по меньшей мере один бактериальный вид или штамм, который быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты, который представляет собой *Lactococcus*, такой как *Lactococcus lactis*. В определенных воплощениях *Lactococcus lactis* представляет собой штамм, депонированный как DSM 11037.

Таким образом, в некоторых воплощениях силосный инокулянт состоит по существу из штамма *Lactobacillus buchneri* и штамма *Enterococcus*, который не уменьшает рост вида (или штамма) облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и который быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты. В других воплощениях силосный инокулянт состоит по существу из штамма *Lactobacillus buchneri* и штамма *Lactococcus*, который не уменьшает рост вида (или штамма) облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и который быстро снижает pH без продуцирования избыточного количества молочной кислоты.

В настоящем изобретении также предложены способы получения ферментированного кормового продукта, такого как силос, включающие инокулирование растительного материала бактериальным силосным инокулянтом, как он раскрыт в данном описании. Неожиданно было обнаружено, что силосные инокулянты, раскрытые в данном описании, способны обеспечивать очень быстрый эффект. То есть, материал, инокулированный бактериальным силосным инокулянтом, как описано, может быть подходящим для использования после короткого периода инкубирования, такого как период инкубирования продолжительностью только 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 суток. Таким образом, в некоторых воплощениях способ включает инкубирование растительного материала с силосным инокулянтом, как раскрыто в данном описании, в течение периода вплоть до 2 суток или вплоть до 4 суток перед воздействием на силос воздуха, как например при открывании силосного бункера. Однако растительный материал также можно инкубировать в течение более длительного периода, как например вплоть до 7 суток, вплоть до 8 суток, вплоть до 14 суток или вплоть до 28 суток или даже дольше, такого как период по меньшей мере 60 суток или по меньшей мере 90 суток, где последнее

представляет собой общепринятый период тестирования действия силосных инокулянтов.

Как отмечено выше, в определенных воплощениях бактериальные силосные инокулянты, раскрытые в описании, могут достигать быстрого снижения рН в начале процесса силосования, в то же время поддерживая высокую аэробную стабильность при выемке силоса. То есть, бактериальные силосные инокулянты, раскрытые в описании, могут осуществлять быстрое начальное ферментирование, которое уменьшает потерю сухого вещества (DM) и порчу на ранней стадии ферментирования, а также могут обеспечивать аэробную стабильность, которая является такой же или сравнимой с таковой при инокулировании только облигатным гетероферментативным штаммом, таким как *L. buchneri*. Таким образом, описанные здесь инокулянты обеспечивают достижение лучшей аэробной стабильности, чем продукты, содержащие только гомоферментативные или/и факультативные гетероферментативные штаммы, хотя их аэробная стабильность может быть не такой хорошей как таковая, достигаемая с помощью только облигатного гетероферментативного *L. buchneri*.

#### **ДЕПОНИРОВАННЫЕ ШТАММЫ**

Штамм *Lactobacillus plantarum* был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7б, D-38124 Braunschweig) с номером доступа DSM 16568 с датой депонирования 13 июля 2004 года Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было проведено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Lactobacillus buchneri* был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7б, D-38124 Braunschweig) с номером доступа DSM 22501 с датой депонирования 22 апреля 2009 года Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было проведено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Enterococcus faecium* был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7б, D-38124 Braunschweig) с номером доступа DSM 22502 с датой депонирования 22

апреля 2009 года Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было проведено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Для описанных выше депонированных микроорганизмов применимы следующие дополнительные указания:

в отношении соответствующих патентных ведомств соответствующих указанных государств заявители требуют, чтобы образец депонированных микроорганизмов, определенных выше, был доступен только для эксперта, назначенного по запросу вплоть до даты, на которую будет выдан патент, или даты, когда заявка будет отклонена, или отозвана, или признана отозванной.

Штамм *Lactobacillus lactis* DSM 11037 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 76, D-38124 Braunschweig) 26 июня 1996 года Chr. Hansen A/S, Denmark, и ссылка на него имеется в выданном патенте EP 928333.

Воплощения настоящего изобретения описаны ниже посредством неограничивающих примеров.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Фиг. 1а

Снижение на протяжении 48 ч pH стерильной силосной среды, инокулированной Композицией 1 ( $\Delta$ ), Композицией 2 ( $\square$ ), Композицией 3 ( $\circ$ ), Композицией 4 ( $\diamond$ ) и Композицией 5 (X). Стартовое инокулирование составляло 150000 КОЕ/мл, поддерживали температуру 30°C, n равно 1.

Фиг. 1б

Концентрация молочной кислоты в мг/мл на протяжении 48 ч в стерильной силосной среде, инокулированной Композицией 1 ( $\Delta$ ), Композицией 2 ( $\square$ ), Композицией 3 ( $\circ$ ), Композицией 4 ( $\diamond$ ) и Композицией 5 (X). Стартовое инокулирование составляло 150000 КОЕ/мл, поддерживали температуру 30°C, n равно 1.

Фиг. 1в

Концентрация уксусной кислоты в мг/мл на протяжении 48 ч в стерильной силосной среде, инокулированной Композицией 1 ( $\Delta$ ), Композицией 2 ( $\square$ ), Композицией 3 ( $\circ$ ), Композицией 4 ( $\diamond$ ) и Композицией 5 (X). Стартовое

инокулирование составляло 150000 КОЕ/мл, поддерживали температуру 30°C, n равно 1.

Фиг. 2

Снижение на протяжении 72 ч pH стерильной силосной среды, инокулированной Композицией 2 (□), Композицией 4 (◇) и Композицией 6 (▬). Стартовое инокулирование составляло 150000 КОЕ/мл, поддерживали температуру 30°C.

Фиг. 3

Соотношение уксусная кислота/молочная кислота у кукурузы, собранной в 2011 году в Дании (мини-силосохранилище 1) и либо не инокулированной (белые столбики), либо инокулированной Композицией 4 (серые столбики) или Композицией 7 (черные столбики). Вакуумированные пакеты мини-силосохранилища хранили при 25 °C до вскрытия через 7, 28, 61 и 88 суток.

Фиг. 4

Аэробная стабильность кукурузы, собранной в 2012 году в Дании (мини-силосохранилище 2), и либо не инокулированной (▬), либо инокулированной Композицией 4 (◇) или Композицией 5 (X). На оси x приведено время (ч) и на оси y приведена температура (°C). Пунктирная черная линия показывает температуру окружающей среды, тогда как пунктирная серая линия показывает температуру окружающей среды + 3°C.

Фиг. 5

pH мини-силосохранилища с кукурузным силосом урожая 2012 года (мини-силосохранилище 2) после семи суток аэробной нагрузки, вкл. SEM от четырех наблюдений. Либо без инокуляции (белый столбик), либо инокулированный Композицией 4 (серый столбик) или Композицией 5 (заполненный точками столбик).

Фиг. 6

Аэробная стабильность кукурузы, собранной в 2013 году в Дании (мини-силосохранилище 3) и либо не инокулированной (▬) либо инокулированной Композицией 2 (□) или Композицией 4 (◇). На оси x приведено время (ч) и на оси y приведена температура (°C). Пунктирная черная линия показывает температуру окружающей среды, тогда как пунктирная серая линия показывает

температуру окружающей среды + 3°C.

Фиг. 7

Аэробная стабильность корма из красной кукурузы урожая 2013 года (мини-силосохранилище 4) и либо не инокулированного (▬), либо инокулированного Композицией 2 (□), Композицией 4 (◇) и Композицией 7 (△). На оси x приведено время (ч) и на оси y приведена температура (°C). Пунктирная черная линия показывает температуру окружающей среды. Пунктирная серая линия показывает температуру окружающей среды + 3°C.

Фиг. 8

Аэробная стабильность корма из смеси красный клевер:тимофеевка луговая:овсяница урожая 2013 года (мини-силосохранилище 5) и либо не инокулированного (▬), либо инокулированного Композицией 2 (□), Композицией 4 (◇), Композицией 7 (△). На оси x приведено время (ч) и на оси y приведена температура (°C). Пунктирная черная линия показывает температуру окружающей среды, тогда как пунктирная серая линия показывает температуру окружающей среды + 3°C.

Фиг. 9а

Аэробная стабильность (часы) кукурузного силоса (мини-силосохранилище 6а) после 7 и 14 суток ферментирования с последующими 7 сутками аэробной нагрузки (7+7 и 14+7, соответственно) и либо не инокулированного (белый), либо инокулированного Композицией 4 (серый) или Композицией 7 (черный).

Фиг. 9б

Аэробная стабильность (часы) кукурузного силоса (мини-силосохранилище 6б) после 2, 4 и 8 суток ферментирования с последующими 7 сутками аэробной нагрузки (2+7, 4+7 и 8+7, соответственно) и либо не инокулированного (белый) или инокулированного Композицией 4 (серый).

Фиг. 10

Количество дрожжей (КОЕ/г) в кукурузном силосе (мини-силосохранилище 6а) после 2, 7 и 14 суток ферментирования и либо не инокулированного (белый), либо инокулированного Композицией 4 (серый) или Композицией 7 (черный).

## Фиг. 11

Изменение рН в кукурузном силосе (мини-силосохранилище 6а) после 2, 7 и 14 суток ферментирования, либо не инокулированном (белый), либо инокулированном Композицией 4 (серый) или Композицией 7 (черный).

## Фиг. 12

Суммарная продукция газа на протяжении 162 часов в кукурузе урожая 2014 года (мини-силосохранилище 7а) и либо не инокулированной (серые квадраты) или инокулированной Композицией 4 (черные круги). На оси x представлено время (ч), и на оси y представлен объем в мл/г свежего корма.

## Фиг. 13

Разница в продуцировании газа между контролем и кукурузой, инокулированной Композицией 4 (мини-силосохранилище 7б). На оси x представлено время (ч), и на оси y представлена разница в объеме в мл/г свежего корма.

## Фиг. 14

Потеря массы в процентах упакованной под вакуумом кукурузы урожая 2014 года через 162 часа (мини-силосохранилище 7б) и либо не инокулированной (белый), либо инокулированной Композицией 4 (серый) или Композицией 7 (черный).

## Фиг. 15

Разница в образовании газа в упакованной под вакуумом кукурузе урожая 2014 года после 6 суток ферментирования. Упакованные под вакуумом пакеты с кормом либо без инокуляции (левая сторона фотографии), либо инокулированным Композицией 4 (150000 КОЕ/г кукурузы, правая сторона фотографии).

**ПРИМЕРЫ**Пример 1 - Стерильные периодические культуры *in vitro*

Отдельные штаммы гомоферментативных и гетероферментативных молочнокислых бактерий и комбинированные продукты тестировали в двух независимых экспериментальных постановках с использованием стерильной силосной среды, содержащей несколько различных источников углеводов для моделирования углеводного состава травы. рН и содержание органических кислот измеряли с течением времени. Среда содержала 5 г/л дрожжевого

экстракта (Oxoid L21), 5 г/л нейтрализованного соевого пептона (Oxoid LP0044C), 0,8 г/л растворимого крахмала (Merck 1252), 0,08 г/л дигидрата сульфата марганца (II) (Sigma M-1114), 0,037 г/л янтарной кислоты (assay lab), 0,069 г/л моногидрата лимонной кислоты и 0,14 L-яблочной кислоты (Merck 244), которые смешивали в 900 мл воды Milli Q до растворения. Подводили pH до 6,3, разливали в миникультуральные флаконы и автоклавировали при 121°C в течение 15 минут. После автоклавирования добавляли 100 мл стерильного профильтрованного сахарного раствора, содержащего 56 г/л D(-)-фруктозы (Merck 4007), 32 г/л D(+)-глюкозы моногидрата (Merck 8342), 20 г/л D(+)-ксилозы (Merck 8689), 20 г/л L(+)-арабинозы (Aldrich A9, 190-6) и 32 г/л сахарозы (Merck 7651), для получения конечной силосной среды. В обоих экспериментах 1 и 2 применяли стерильную силосную среду и инокулировали несколькими различными композициями инокулянтов, представленными в Таблице 1.

Таблица 1

Композиции штаммов, используемых в двух исследованиях периодической культуры *in vitro*

№ композици и	Эксперимент	Штаммы бактерий	Процентное соотношение	КОЕ/мл
1	1	<i>L. plantarum</i> DSM 16568	100	150000
2	1, 2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	150000
3	1	<i>L. lactis</i> DSM 11037	100	150000
4	1, 2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>L. lactis</i> DSM 11037	50 50	150000
5	1	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>L. lactis</i> DSM 11037 <i>L. plantarum</i> DSM 16568	70 20 10	150000
6	2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>L. plantarum</i> DSM 16568	50 50	150000

#### Эксперимент 1

По 10 мл силосной среды, инокулированной различными композициями инокулянтов из Таблицы 1, распределяли в каждую из одиннадцати стерильных пробирок и выдерживали на водяной бане при 30°C. Через 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 24 и 48 часов отбирали образцы на анализ летучей органической кислоты (VFA) и молочной кислоты и pH. pH контролировали с использованием ручного pH-метра, в то время как летучие органические кислоты анализировали путем

ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) (Dionex).

### *Эксперимент 2*

Эксперимент 2 был подобен эксперименту 1 в отношении стерильной питательной среды, уровня инокуляции и температуры. В качестве инокулянтов использовали Композиции 2, 4 и 6. Использовали автоматический рН-метр и уксусную кислоту, молочную кислоту и муравьиную кислоту измеряли посредством ВЭЖХ (Dionex) через 72 ч.

### *Результаты*

Результаты экспериментов 1 и 2, демонстрирующие эффекты различных композиций инокулянтов в отношении рН и содержания органических кислот, представлены на Фиг. 1а, б, в и Фиг. 2, а также в Таблице 2.

На Фиг 1а показано изменение рН с течением времени в Эксперименте 1. Композиция 2 снижала рН очень медленно. Композиция 1 и Композиция 3 снижали рН значительно быстрее, и через 14 часов рН был ниже 5,0, в то время как Композиция 2 все еще имела рН выше 6,0. Композиция 4 снижала рН так же быстро как Композиция 3. Композиция 5 давала кривую рН, очень похожую на кривую для Композиции 1.

На Фиг. 1б показана концентрация молочной кислоты с течением времени в Эксперименте 1. Через 24 часа Композиция 1 продуцировала значительно больше молочной кислоты по сравнению с Композицией 2, Композицией 3 или Композицией 4. Через 48 часов концентрация молочной кислоты в случае Композиции 1 составила более чем 8 мг/мл против 4 мг/мл или ниже с Композицией 2, Композицией 3 или Композицией 4. Композиция 5 давала концентрацию молочной кислоты, очень близкую к таковой для Композиции 1.

На Фиг. 1в показана концентрация уксусной кислоты с течением времени в Эксперименте 1. Через 48 часов Композиция 2 имела концентрацию уксусной кислоты более 2 мг/мл, в то время как Композиция 1 и Композиция 3 продуцировали менее чем 0,5 мг/мл уксусной кислоты. Композиция 4 продуцировала 1 мг/мл уксусной кислоты через 48 часов, в то время как Композиция 5 имела результатом концентрацию менее чем 0,5 мг/мл.

На Фиг. 2 показано изменение рН с течением времени в Эксперименте 2. Снова Композиция 2 снижала рН очень медленно. Композиция 4 снижала рН

значительно быстрее, и через 15 часов pH был ниже 4,5, в то время как Композиция 6 все еще имела pH выше 6,0. Композиция 6 приводила к немного более медленному падению pH по сравнению с Композицией 4. Однако снижение pH продолжалось быстро, и pH был ниже 4,0 уже через 18 часов. Через 72 часа pH Композиции 2 и Композиции 4 достигал 3,6 и 3,7, соответственно, в то время как pH Композиции 6 становился ниже 3,2.

Таблица 2

Продуцирование органических кислот инокулированной стерильной силосной средой через 72 часа (Эксперимент 2)

№ Композиции	Бактериальные штаммы	%	Муравьиная кислота (мг/мл)	Уксусная кислота (мг/мл)	Молочная кислота (мг/мл)
2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	0,012	2,895	4,077
4	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	0,447	1,760	3,488
	<i>L. lactis</i> DSM 11037	50			
6	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	0,014	0,554	10,777
	<i>L. plantarum</i> DSM 16568	50			

Как видно из Таблицы 2, продуцирование уксусной кислоты было сильно снижено у Композиции 6, которая содержит *L. buchneri* DSM 22501 и *L. plantarum* DSM 16568, в отличие от Композиции 4, которая содержит *L. buchneri* DSM 22501 и *L. lactis* DSM 11037. Композиция 6 также демонстрировала высокую концентрацию молочной кислоты через 72 часа. Композиция 4 не только имела значительно более высокую концентрацию уксусной кислоты по сравнению с Композицией 6, но также она имела высокую концентрацию муравьиной кислоты.

Пример 2 – Аэробная стабильность в мини-силосохранилищах

*Мини-силосохранилища 1, 2 и 3 – Урожай кукурузы 2011, 2012 и 2013 годов, Дания*

Эксперименты с пятью различными мини-силосохранилищами были проведены для тестирования различных композиций разных силосных инокулянтов. Три эксперимента были проведены в Дании с кукурузой,

собранный на трех различных фермах в 2011 году (мини-силосохранилище 1), 2012 году (мини-силосохранилище 2) и 2013 году (мини-силосохранилище 3), и два эксперимента были проведены в Литве в 2013 году с использованием кукурузы и газонной смеси красный клевер:тимофеевка луговая:овсяница (60:30:10) (мини-силосохранилища 4 и 5). Обзор использованных инокулянтов и дозы внесения представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Композиции штаммов, использованных в исследованиях мини-силосохранилищ

№ Ком-позиции	№ мини-силосо-хранилища	Корм	Бактериальные штаммы	Процент-ное со-держание	КОЕ/г корма
Без добавок	1, 2, 3, 4, 6, 7а, 7б 5	Кукуруза Трава/Кле-вер		0	
2	3, 4 5	Кукуруза Трава/кле-вер	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	150000
4	1, 2, 3, 4, 6, 7а, 7б 5	Кукуруза Трава/кле-вер	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>L. lactis</i> DSM 11037	50 50	150000
5	2	Кукуруза	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>L. lactis</i> DSM 11037 <i>L. plantarum</i> DSM 16568	70 20 10	150000
7	1, 4 5, 6	Кукуруза Трава/кле-вер	<i>L. buchneri</i> DSM 22501 <i>E. faecium</i> DSM 22502 <i>L. plantarum</i> DSM 16568	50 30 20	150000

Для мини-силосохранилища 1 кукурузу собирали в Юго-Западной Ютландии. Время транспортировки в лабораторию составило 4 часа. Затем кукурузу хранили в течение ночи на открытом воздухе, после чего ее замораживали при -20°C. Ко времени инокулирования кукурузу размораживали в течение 1-2 часов и затем хранили в холодильнике при 4-5°C. Инокулянты суспендировали в водопроводной воде и помещали во флаконы с

разбрызгивателем. Целевая дозировка для каждой обработки составила 150000 КОЕ/г кукурузы, и количество, необходимое для достижения целевой дозировки инокулюма, рассчитывали на основании фактической активности композиций. 1000 г кукурузы отвешивали в пластиковый пакет понемногу за раз, так чтобы инокулянт можно было гомогенно разбрызгать на кукурузу. Затем пакет встряхивали для того, чтобы обеспечить равномерное распределение инокулюма в пакете. Затем 1000 г инокулированной кукурузы распределяли в пять пакетов из алюминиевой фольги (alubag) по 200 г в каждый для каждого момента времени (7, 28, 61 и 88 суток). Упакованные под вакуумом пакеты из алюминиевой фольги хранили при 25°C.

Пять пакетов из алюминиевой фольги на обработку открывали в различные моменты времени. Затем образцы исследовали на содержание низкомолекулярных органических кислот.

Для мини-силосохранилища 2 свежий урожай кукурузы собирали с фермы в центральной Зеландии, Дания, и транспортировали прямо в лабораторию. Пять различных обработок, перечисленных в Таблице 3, а также контрольную группу тестировали в постановке мини-силосохранилища. Инокулянты суспендировали в водопроводной воде и помещали во флаконы с разбрызгивателем. Целевая дозировка для каждой обработки составила 150000 КОЕ/г кукурузы и количество, необходимое для достижения целевой дозировки инокулюма, рассчитывали на основании фактической активности продуктов. 1000 г кукурузы отвешивали в пакет понемногу за раз, так чтобы инокулянт можно было гомогенно разбрызгать на кукурузу. После встряхивания пакета для того, чтобы обеспечить равномерное распределение инокулюма, пакет упаковывали под вакуумом. Четыре пакета для каждой обработки приготавливали и хранили при 25°C для дальнейшего анализа через три месяца. Через три месяца проводили исследование аэробной стабильности с использованием силоса, который хранили в вакуумированных пакетах. Силос расфасовывали в контейнеры (пластиковые бутылки, открытые сверху с отверстием в дне) с сенсором температуры, расположенным в середине, помещенным в лунку в полистироле, покрытые большой пластиковой тарелкой, и хранили при комнатной температуре. Температуру каждого индивидуального образца после экспозиции на воздухе контролировали в течение периода 7

суток.

Для мини-силосохранилища 3 свежий урожай кукурузы собирали с фермы в северо-восточной Зеландии. Процедура была такой же, как описано для мини-силосохранилища 2, за исключением того, что исследование аэробной стабильности проводили только через две недели.

#### *Результаты мини-силосохранилищ 1, 2 и 3*

Соотношения уксусной кислоты и молочной кислоты в силосе мини-силосохранилища 1 в различные моменты времени показаны на Фиг. 3. Соотношение уксусной кислоты и молочной кислоты выше в неинокулированном контроле по сравнению с Композицией 7 через семь суток и через 28 суток. Однако через 88 суток Композиция 7 имеет высокое соотношение уксусной кислоты к молочной кислоте по сравнению с контролем. Композиция 4 имеет высокое соотношение уксусной кислоты к молочной кислоте с седьмых суток, которое повышается с течением времени. Средний pH всех образцов был ниже 4,0 во все моменты времени.

Результаты мини-силосохранилища 2 показаны на Фиг. 4. Можно видеть, что температура неинокулированного контрольного силоса была более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 78 часов, в то время как Композиция 5 давала повышение более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 96 часов. Композиция 4 поддерживала кукурузный силос в стабильном состоянии в течение всех 162 часов измерения. Как показано на Фиг. 5, через 162 часа pH в контроле составлял в среднем 6,74, в то время как силос, обработанный Композицией 5, имел средний pH 5,67, а силос, обработанный Композицией 4, имел pH в среднем 4,05.

Для мини-силосохранилища 3 хранившийся в вакуумированном пакете силос, открытый после хранения, который не был инокулирован, был нестабилен через 93 часа, в то время как силос, инокулированный Композицией 2, был стабилен в течение всего периода в 160 часов, а силос, инокулированный Композицией 4, был стабилен в течение 129 часов (Фиг. 6).

*Мини-силосохранилища 4 и 5 – Кукуруза и трава/клевер урожая 2013 года, Литва*

Для мини-силосохранилища 4 кукурузу (*Zea mays* L.) собирали в фазе восковой спелости созревания зерна. Концентрация сухого вещества (DM)

кукурузы составила 38,85%, и концентрация водорастворимых углеводов составила 2,54%. Кукурузу разрубали с помощью силосоуборочного комбайна в условиях фермы на куски примерно 2 см длиной.

Для мини-силосохранилища 5 смесь трава-клевер, содержащую травосмесь из 60% красного клевера, 30% тимофеевки луговой и 10% овсяницы, собирали и высушивали до содержания сухого вещества 32,8%. Эту кормовую смесь называют смесью трава/клевер. Содержание водорастворимых углеводов составило 20,3 г/кг DM (2,03% свежего корма). Смесь трава/клевер разрубали с помощью силосоуборочного комбайна в условиях фермы на куски 2-3 см длиной.

Для мини-силосохранилища 4 и мини-силосохранилища 5 пять репрезентативных образцов (более 500 г каждый) брали для анализа питательной ценности обоих кормов и обработки. Корма транспортировали в полиэтиленовом пакете в лабораторию. Лабораторные эксперименты начинали в пределах 0,5 ч от подготовки культур. 500 г репрезентативного образца подвявшей и нарубленной травы брали на анализы питательной ценности, буферной емкости, нитратного и микробного состава. В испытаниях кукурузного корма и корма трава/клевер использовали одни и те же силосные инокулянты и процедуру.

Силосный инокулянт суспендировали в дистиллированной воде непосредственно перед его применением, применяя дозу такую как описано в Таблице 3. Для каждой обработки проводили пять повторов. Дозировки продуктов рассчитывали в соответствии с дозами, указанными в Таблице 3, и реальной концентрацией бактерий в продуктах. При разведении продуктов использовали воду без хлора. Такой же объем дистиллированной воды использовали вместо суспензии в контрольной обработке (для самопроизвольной ферментации). После инокулирования в 3 л стеклянные банки помещали 1,80–1,84 кг свежей культуры, что эквивалентно 1 кг DM на объем 5 литров. Банки закрывали крышками через 15 мин после заполнения. Газ, образующийся во время ферментации, во время эксперимента выпускали через воздушный клапан. Через 90 суток хранения в стеклянных банках при постоянной температуре 20°C проводили химический и микробный анализы.

Для измерения аэробной стабильности силосов контролировали

температуру внутри силоса в течение 10 суток. Для этого термопару вставляли в срединную точку силосных образцов, которые помещали в открытые полистирольные коробки. В верхней части и в дне коробок имелось отверстие диаметром 2 см для обеспечения доступа воздуха и выхода CO<sub>2</sub>. В центр силосной массы помещали датчик через отверстие в крышке коробки, которое открывало доступ воздуха к силосу. На эти силосы не оказывали никакого воздействия на протяжении периода записи температур. Коробки держали при постоянной комнатной температуре (примерно 20°C). Температуру окружающей среды и температуру каждого силоса записывали каждые 6 ч с помощью регистрирующего устройства. Температуру окружающей среды в помещении измеряли с использованием пустой контрольной коробки. Аэробную стабильность силосов изучали путем расчета разницы между температурой силоса и температуры окружающей среды в помещении. Аэробная порча была отмечена на сутки (или часы), когда начиналось устойчивое повышение температуры более чем на 3°C выше температуры окружающей среды.

Таблица 4

## Аналитические методы

Параметры качества	Объект	Короткое описание или сущность метода, ссылка
Сухое вещество (DM)	Трава* Силос**	Высушивали в печи при 67°C в течение 24 ч, оставляли на ночь до достижения комнатной влажности, пропускали через 1 мм сито и далее высушивали при 105°C до постоянной массы
Неочищенный белок	* **	Kjeldahl-AOAC 984.13. Используют 10,5 г катализатора. С Block Digestion и Tecator Kjeltac system 1002 Distilling Unit
Неочищенный жир	* **	Экстракция с помощью Soxtec System с использованием петролейного эфира 40-600C. Остаток неочищенного жира определяли гравиметрически после высушивания
Неочищенные волокна	* **	С Fibercap (Foss Tecator), используя обработку серной кислотой и гидроксидом Na
Кислотно-детергентная клетчатка (ADF)	* **	ANKOM A200 технология фильтровальных пакетиков (ТФП)
Нейтрально-детергентная клетчатка (NDF)	* **	A200 технология фильтровальных пакетиков (ТФП)

Водорастворимые углеводы (WSC)	* **	С использованием анализа антроновой реакции (MAFF, 1986) из экстрактов травы или силоса, полученных при вымачивании свежей травы или силоса в воде
Сырая зола	* **	AOAC Method 942.05. Ca - AOAC 968.08 сухое озоление, метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии, P – спектрофотометрический молибдованадофосфатный (Molybdovanadophosphate) метод
Буферная емкость	*	Согласно Playne и McDonald (1966), выражали как миллиэквивалент (mequiv) щелочи, требуемой для изменения pH с 4 до 6 на 100 г сухого вещества
Нитраты	*	Травяные экстракты, полученные при вымачивании свежей травы в воде, анализировали с использованием селективного электрода для нитрат-иона
Молочная кислота	**	В водном экстракте из свежего силоса в соответствии со стандартными способами (Naumann и Bassler, 1997)
Уксусная кислота	**	
Масляная кислота	**	
Аммиачный N	**	Дистилляция – AOAC 941.04
pH через 3, 90 и 97 суток pH перед силосованием	** *	Экстракты силоса, полученного при вымачивании свежей травы в воде, анализировали с использованием ThermoOrion Posi-pHlo SympHony Electrode и Thermo Orion 410 meter
Потеря массы (потери DM)	**	Оценивали путем измерения разницы массы силоса до и после силосования
Дрожжи и плесени	* **	LST ISO 21527-2:2008
Молочнокислые бактерии	*	ISO 15214:1998
Клостридии***	*	ISO 7937:2004

\* Пять образцов травы для анализа были собраны непосредственно после опрыскивания и во время заполнения силосов  
 \*\* Образцы силоса для каждого силоса в каждом варианте (включая контроль) были взяты через 90 суток хранения  
 \*\*\* Если было более чем 1500 КОЕ/г клостридий в свежем корме, проводили анализ силоса на клостридии

Концентрации VFA (летучих жирных кислот), молочной кислоты и низших спиртов определяли путем газо-жидкостной хроматографии водных силосных экстрактов, полученных путем вымачивания 30 г свежего силоса в 150 мл

деионизированной воды в течение 16 часов при 40°C в запаянном контейнере с последующим предварительным фильтрованием через 3 мкм фильтровальную бумагу. Деионизированную воду (3 мл) внутреннего стандартного раствора (0,5 г 3-метил-н-валериановой кислоты в 1000 мл 0,15 моль l-1 щавелевой кислоты) добавляли к 1 мл фильтрата, полученного как описано выше, и раствор фильтровали через 0,45 мкм полиэфирсульфоновую мембрану в пробирку для хроматографического образца для анализа. В газо-жидкостном хроматографе GC -2010 SHIMADZU использовали капиллярную колонку с широким просветом (Stabilwax®-DA 30 м, 0,53 мм, ID, 0,5 мкм) в соответствии с официально принятыми методами газовой хроматографии и биохимического анализатора. Аммонийный азот (NH<sub>3</sub>-N) определяли путем дистилляции – AOAC 941.04.

#### *Результаты мини-силосохранилищ 4 и 5*

Результаты для кукурузного мини-силосохранилища 4 показаны в Таблице 5. Все три инокулированных кукурузных силоса имели существенно ( $P > 0,05$ ) более низкий pH по сравнению с контролем через 3 суток анаэробного ферментирования. Композиция 4 и Композиция 7 имели существенно меньшую потерю DM (%/кг), существенно меньшую ( $P < 0,05$ ) фракцию N-NH<sub>3</sub> (%/кг общего N) и существенно ( $P < 0,05$ ) более высокую концентрацию молочной кислоты (%/кг DM) по сравнению с Композицией 2 и контролем. Инокулирование кукурузы Композицией 2 и Композицией 4 приводило к существенно ( $P < 0,05$ ) более высоким концентрациям уксусной кислоты (%/кг DM) и пропионовой кислоты (%/кг DM) по сравнению с Композицией 7 и контролем. Все инокулированные кукурузные силосы имели более низкое содержание дрожжей и плесени (log КОЕ/г) по сравнению с контролем.

Как можно увидеть на Фиг. 7, аэробная экспозиция в течение 10 суток приводила к повышению температуры более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 66 часов для неинокулированного контрольного силоса, в то время как Композиция 7 приводила к подъему более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 178 часов, что представляло собой существенно ( $P < 0,05$ ) более длительный промежуток времени по сравнению с контролем и существенно ( $P < 0,05$ ) более короткий промежуток времени по сравнению с Композициями 2 и 4. Через 240 часов аэробной экспозиции pH в контроле составил 8,29, в то время как Композиция 7 имела pH

5,66, что было существенно ( $P < 0,05$ ) ниже по сравнению с контролем.

Таблица 5

Действие различных композиций на переменные ферментирования и микробный состав засилосованной кукурузы

	Контроль	Композиция 2 (процентное содержание)	Композиция 4 (процентное содержание)	Композиция 7 (процентное содержание)
<i>L. buchneri</i> DSM 22501		100	50	50
<i>L. lactis</i> DSM 11037			50	
<i>E. faecium</i> DSM 22502				30
<i>L. plantarum</i> DSM 16568				20
Измерение после 3 суток анаэробного ферментирования				
pH через 3 суток	4,36 <sup>a</sup>	4,18 <sup>b</sup>	4,17 <sup>b</sup>	4,14 <sup>b</sup>
Измерение после 90 суток анаэробного ферментирования				
pH через 90 суток	4,04 <sup>a</sup>	3,91 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>
DM, %/кг desiled†	36,69 <sup>a</sup>	37,52 <sup>b</sup>	37,62 <sup>b</sup>	37,77 <sup>b</sup>
Потеря DM, %/кг	6,74 <sup>a</sup>	4,42 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>	3,43 <sup>b</sup>
Фракция N-NH <sub>3</sub> , %/кг общего N	5,18 <sup>a</sup>	4,38 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>	3,83 <sup>b</sup>
Молочная кислота, %/кг DM	2,78 <sup>a</sup>	3,01 <sup>a</sup>	3,47 <sup>b</sup>	4,06 <sup>b</sup>
Уксусная кислота, %/кг DM	1,11 <sup>b</sup>	2,83 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	1,72 <sup>b</sup>
Масляная кислота, %/кг DM	0,034 <sup>a</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,004 <sup>b</sup>
Пропионовая кислота, %/кг DM	0,012 <sup>b</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,026 <sup>a</sup>	0,012 <sup>b</sup>
Спирты, %/кг DM	1,00 <sup>a</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,49 <sup>b</sup>
Дрожжи (log КОЕ/г)	3,93 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>	1,26 <sup>b</sup>	1,56 <sup>b</sup>

Плесени (log КОЕ/г)	3,00 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,25 <sup>B</sup>
Измерение после 10 суток аэробной экспозиции				
pH после теста аэробной стабильности	8,29 <sup>a</sup>	4,44 <sup>b</sup>	4,39 <sup>b</sup>	5,66 <sup>B</sup>
Аэробная стабильность, часы	66,0 <sup>b</sup>	240,0 <sup>a</sup>	240,0 <sup>a</sup>	177,6 <sup>B</sup>

Разные буквы в строке показывают статистически значимое различие ( $P < 0,05$ )

Не было вытекания в силосах при открывании

†Сухое вещество с поправкой на летучие компоненты

Результаты по мини-силосохранилищу 5 с использованием смеси трава/клевер показаны в Таблице 6. Все три инокулированных силоса трава/клевер имели существенно ( $P > 0,05$ ) более низкий pH по сравнению с контролем через 3 суток анаэробного ферментирования. Композиция 4 и Композиция 7 имели существенно ( $P < 0,05$ ) меньшую потерю DM (%/кг). В то время как весь инокулированный силос трава/клевер имел существенно ( $P < 0,05$ ) меньшую фракцию N-NH<sub>3</sub> (%/кг общего N) по сравнению с контролем и существенно ( $P < 0,05$ ) более высокую концентрацию молочной кислоты (%/кг DM), чем в контроле, инокулирование кукурузы Композицией 4 приводило к существенно ( $P < 0,05$ ) более высокой концентрации уксусной кислоты (%/кг DM) по сравнению с Композицией 7 и контролем. Все инокулированные силосы трава/клевер имели более низкое количество дрожжей и плесени (log КОЕ/г) по сравнению с контролем.

Как можно видеть на Фиг. 8, аэробная экспозиция в течение 10 суток приводила к повышению температуры неинокулированного контрольного силоса более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 91 час, в то время как Композиция 7 приводила к подъему температуры более чем на 3°C выше температуры окружающей среды через 169 часов. Композиция 4 приводила к подъему температуры более чем на 3°C через 191 час, и Композиция 2 давала такое же повышение через 214 часов. Через 240 часа аэробной экспозиции pH в контроле составил 7,93, в то время как pH Композиции 7 составил 5,41, pH Композиции 4 составил 5,35, и pH Композиции

2 был самым низким и составил 4,93.

Таблица 6

Действие различных Композиций на переменные ферментирования и микробный состав силоса красный клевер: тимофеевка луговая: овсяница

Обработка	Контроль	Композиция 2 (процентное содержание)	Композиция 4 (процентное содержание)	Композиция 7 (процентное содержание)
<i>L. buchneri</i> DSM 22501		100	50	50
<i>L. lactis</i> DSM 11037			50	
<i>E. faecium</i> DSM 22502				30
<i>L. plantarum</i> DSM 16568				20
Измерение после 3 суток анаэробного ферментирования				
pH через 3 суток	4,75 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,40 <sup>b</sup>	4,34 <sup>b</sup>
Измерение после 90 суток анаэробного ферментирования				
pH через 90 суток	4,38 <sup>a</sup>	4,20 <sup>b</sup>	4,17 <sup>b</sup>	4,12 <sup>b</sup>
DM, %/кг desiled†	30,49 <sup>a</sup>	31,19 <sup>b</sup>	31,45 <sup>b</sup>	31,64 <sup>b</sup>
Потеря DM, %/кг	7,90 <sup>a</sup>	6,20 <sup>b</sup>	4,94 <sup>b</sup>	4,23 <sup>b</sup>
Фракция N-NH <sub>3</sub> , %/кг общего N	5,38 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>	3,79 <sup>b</sup>	3,57 <sup>b</sup>
Молочная кислота, %/кг DM	4,55 <sup>a</sup>	6,28 <sup>b</sup>	5,34 <sup>b</sup>	5,89 <sup>b</sup>
Уксусная кислота, %/кг DM	2,42 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	3,59 <sup>b</sup>	2,01 <sup>b</sup>
Масляная кислота, %/кг DM	0,24 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>
Пропионовая кислота, %/кг DM	0,02 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>
Спирты, %/кг DM	0,94 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,69 <sup>b</sup>
Дрожжи (log КОЕ/г)	3,21 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,65 <sup>b</sup>
Плесени (log КОЕ/г)	3,03 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	1,32 <sup>b</sup>	1,34 <sup>b</sup>
Измерение после 10 суток аэробной экспозиции				
pH после теста аэробной стабильности	7,93 <sup>a</sup>	4,93 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	5,41 <sup>b</sup>
Аэробная стабильность, часы	91,20 <sup>a</sup>	213,60 <sup>b</sup>	190,8 <sup>b</sup>	169,20 <sup>b</sup>

Разные буквы в строке показывают статистически значимое различие (P < 0,05)

Не было вытекания в силосах при открывании

†Сухое вещество с поправкой на летучие компоненты

*Мини-силосохранилище 6а - урожай кукурузы 2014, США*

Для мини-силосохранилища 6а кукурузу собирали в Делаваре, США, при примерно 35%-ном содержании DM в целом растении. Композиции 4 и 7 растворяли в деионизированной воде и наносили на пять 20-кг пачек свеженарубленного кукурузного корма на обработку для получения верных повторов. Корм из каждой пачки силосовали в 7,6 л силосных ведрах и закрывали пластиковыми крышками с кольцевыми уплотняющими прокладками.

Всего было приготовлено 5 образцов в сутки 0 (свежий материал) и 5 ведер на обработку для каждого интервала ферментирования (сутки 2, 7 и 14). Ведра были заполнены примерно 6 кг свежего корма для достижения конечной плотности упаковки 0,208-0,266 кг DM/л. Ведра хранили при 22±1°C и открывали через 2, 7 и 14 суток силосования.

Для определения аэробной стабильности 2 кг репрезентативного образца из каждого силоса помещали в чистое ведро (без упаковывания) и регистрирующее устройство помещали в геометрический центр кормовой массы. Регистрирующие устройства были установлены так, чтобы они записывали температуру каждые 10 минут и брали среднее за час. Ведра сверху закрывали марлей для предупреждения избыточного высушивания и оставляли инкубироваться в помещении при 22±1°C. Температуру окружающей среды в помещении измеряли и записывали одновременно. Аэробную стабильность определяли как промежуток времени до того как температура силосной массы повышалась на 3°C выше стабильной базовой линии после экспозиции на воздухе.

*Результаты мини-силосохранилища 6а*

Результаты мини-силосохранилища 6а показаны на Фиг. 10 и 11 и в Таблице 7а.

Таблица 7а

Действие различных композиций на pH и содержание дрожжей при открывании после различных периодов ферментирования и на аэробную стабильность на протяжении периода в 7 суток аэробной нагрузки

<b>Сутки 0</b>	Контроль	Композиция 4	Композиция 7
pH	5,75	5,73	5,80
<b>При открывании после 2 суток ферментирования</b>			
pH	3,92	3,91	3,90

Дрожжи, КОЕ/г	524807	467735	891251
<b>При открывании после 7 суток ферментирования</b>			
pH	3,62	3,62	3,64
Дрожжи, КОЕ/г	144543	186208	151356
<b>После 7 суток ферментирования и 7 суток аэробной нагрузки</b>			
Аэробная стабильность, ч	41	44	41
<b>При открывании после 14 суток ферментирования</b>			
pH	3,63	3,61	3,63
Дрожжи, КОЕ/г	6918	1445	1819
<b>После 14 суток ферментирования и 7 суток аэробной нагрузки</b>			
Аэробная стабильность, ч	57	66	63

*Мини-силосохранилище 6б – урожай кукурузы 2014 года, Литва*

Для мини-силосохранилища 6б кукурузу собирали в Литве при содержании DM в целом растении примерно 35%. Композицию 4 растворяли в деионизированной воде и применяли 150000 КОЕ/г корма на пачку свеженарубленного кукурузного корма для получения истинных повторов. Корм из этой пачки, также как и пачки необработанного контроля силосовали в 3 л стеклянных банках, запечатанных кольцевыми уплотняющими прокладками.

Всего было приготовлено 5 образцов в сутки 0 (свежий материал) и 5 стеклянных банок на обработку для каждого интервала ферментирования (сутки 2, 4 и 8). В банки помещали примерно 1 кг свежего корма для достижения конечной плотности упаковки 0,208-0,266 кг DM/л. Стеклянные банки хранили при (20±1°C) и открывали после 2, 4 и 8 суток анаэробной ферментирования.

**Аэробная стабильность**

Аэробную стабильность определяли путем контролирования повышения температуры в силосах, хранящихся в емкостях-термосах из ПВХ (поливинилхлорид) (1300 мл) при температуре окружающей среды 20±1°C (комнатная температура, зафиксированная во время эксперимента). (Фиг. 9а)

Аэробную порчу отмечали по часам до тех пор, пока температура силоса не достигала 3°C выше температуры окружающей среды (Таблица 7б и Фиг. 9б).

*Результаты мини-силосохранилища 6б*

Таблица 7б

Влияние Композиции 4 на аэробную стабильность

	Контроль	Композиция 4
<b>2 суток анаэробного ферментирования и 7 суток аэробной нагрузки</b>		
Аэробная стабильность, ч	30	48
<b>4 суток анаэробного ферментирования и 7 суток аэробной нагрузки</b>		
Аэробная стабильность, ч	40	50
<b>8 суток анаэробного ферментирования и 7 суток аэробной нагрузки</b>		
Аэробная стабильность, ч	68	97

Увеличение времени анаэробного ферментирования увеличивало стабильность как контрольного силоса, так и кукурузного силоса, инокулированного Композицией 4. Следует отметить, однако, что инокулирование Композицией 4 позволяло сохранить кукурузный силос стабильным на 18 часов дольше, чем в контроле после только двух суток анаэробного ферментирования, и что различие между контролем и Композицией 4 продолжает быть существенным (10 и 29 часов, соответственно) при ферментировании в течение 4 суток или 8 суток до аэробной нагрузки.

*Мини-силосохранилища 7а, 7б и 7в – урожай кукурузы 2014 года, Дания*

Для мини-силосохранилища 7а свежий урожай кукурузы (28,6% DM) собирали с фермы в Северной Зеландии, Дания, и транспортировали прямо в лабораторию. Эту кукурузу использовали для проверки действия Композиции 4 относительно контроля с использованием 1,8 л стеклянных банок с автоматическими клапанами для отведения газа ([www.ANKOM.com](http://www.ANKOM.com)). В стеклянные банки помещали в среднем по 746 г свежесобранной кукурузы, которую либо инокулировали 150000 КОЕ/г Композиции 4 (n=5), либо инокулировали таким же количеством водопроводной воды (n=5) в качестве контроля. Банки хранили при комнатной температуре приблизительно при 21°C. Образование газа измеряли с 10-минутным интервалом автоматически, и газ выпускали также автоматически при достижении 1,5 фунт. на кв. дюйм (10,3 кПа). Аккумулированный газ конвертировали в мл на г свежего корма (Объем = P (давление в фунт. на кв. дюйм) x C (объем банки)/среднее атмосферное

давление, записанное от 0 до 162 часов x весь образец корма (масса свежего образца)). Образование газа измеряли в течение 162 часов (Фиг. 12) и разница между контролем и кукурузой, обработанной Композицией 4, показана на Фиг. 13.

Для мини-силосохранилища 7б один кг такой же кукурузы как в мини-силосохранилище 7а использовали в те же сутки, и упаковывали с вакуумированием путем удаления 90% воздуха и запечатывали. Использовали пять пакетов на обработку либо без инокулирования (белый столбик), либо с Композицией 4 (150000 КОЕ/г кукурузы, серый столбик) или Композицией 7 (150000 КОЕ/г кукурузы, столбик, заполненный точками). Через 162 часа пакеты открывали, газ выпускали и измеряли потерю массы (Фиг. 14).

Для мини-силосохранилища “в” такую же кукурузу, как в мини-силосохранилище 7а, использовали после того, как ее хранили в холодильнике при -18°C. После этого корм размораживали и образцы по одному кг упаковывали с вакуумированием путем удаления 90% воздуха и запечатывали. Упакованные под вакуумом пакеты корма либо без инокулянта, либо с Композицией 4 (150000 КОЕ/г кукурузы) оставляли на открытом воздухе при температуре окружающей среды для моделирования “реальных условий вне помещения” и для того, чтобы исследовать образование газа после 6 суток ферментирования (Фиг. 15).

#### *Результаты мини-силосохранилищ 7а, 7б и 7в*

Очень раннее (первые 48 часов) образование газа в силосе связано с эпифитными аэробными микроорганизмами из семейства *Enterobacteriaceae* (например *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* и так далее). Образование газа имеет отношение к потере силосом питательных веществ. Инокулирование кукурузы Композицией 4 имело результатом меньшее образование газа по сравнению с неинокулированной кукурузой (Фиг. 12). Разница в образовании газа увеличивалась от 10 часов до 116 часов, где она была максимальной с разницей в 0,17 мл газа на г кукурузы (Фиг. 13).

В упакованной под вакуумом кукурузе потерю питательных веществ можно оценивать путем взвешивания пакетов. Композиция 4 давала меньшую потерю массы по сравнению с контролем, а также по сравнению с Композицией 7 (Фиг. 14).

В реальных условиях многие фермеры знают по опыту, что их силосные бункеры имеют тенденцию “раздуваться” после запечатывания. Как показано на Фиг. 15, различие в выработке газа в отсутствие инокуляции (левая сторона) и при инокулировании Композицией 4 (правая сторона) можно легко определить визуально.

#### Обсуждение

Известно, что уксусная кислота, продуцируемая *L. buchneri*, является важной кислотой для борьбы с ростом аэробных штаммов, вызывающих порчу, на выходе, где силос открыт для контакта с кислородом. Однако рост *L. buchneri* имеет длительную лаг-фазу, и снижение pH с применением *L. buchneri* происходит очень медленно. Для решения этой задачи *L. buchneri* комбинировали с видом бактерий с высокой продукцией молочной кислоты, таким как *L. plantarum*. Однако комбинация штаммов с высокой продукцией молочной кислоты может препятствовать эффективному действию *L. buchneri* на аэробную стабильность. Это явление показано в Мини-силосохранилище 2, где Композиция 5, содержащая 70% *L. buchneri* DSM 22501 и 10% *L. plantarum* DSM 16568, 20% *L. lactis* DSM 11037, приводила к образованию значительно менее стабильного силоса по сравнению с Композицией 4, которая содержала только штамм с низкой продукцией молочной кислоты (50% *L. lactis* DSM 11037), комбинированный с *L. buchneri* DSM 22501 (50%) (Фиг. 4)

Композиция 4 приводила к быстрому и высокому конечному уровню pH по сравнению с другими комбинациями с видом с высокой продукцией молочной кислоты. Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы изобретения полагают, что в Композиции 4 *L. buchneri* DSM 22501 все еще был способен продолжать рост и/или быть метаболически активным, как видно по высокому уровню уксусной кислоты (Фиг. 1в). Высокое соотношение уксусная кислота/молочная кислота Композиции 4 также видно в мини-силосохранилище 1 (Фиг. 3). Дополнительно, высокое соотношение уксусная кислота/молочная кислота на ранней стадии анаэробного ферментирования очевидно оказывало положительное действие на аэробную стабильность в мини-силосохранилище 3, которое открывали только после короткого периода (2 недели) анаэробного ферментирования.

Эти результаты также показывают, что потеря DM, важный показатель

качества корма, был так же низок для Композиции 4, как для продуктов, содержащих штаммы с высокой продукцией молочной кислоты (смотри мини-силос 4 и мини-силос 5), в то время как Композиция 4 также давала высокий уровень продукции уксусной кислоты. Высокий уровень уксусной кислоты давал очень стабильный силос (Фиг. 4, 5, 6 и 7), который во всех трех случаях с мини-силосохранилищами (Пример 2) был выше по сравнению с другими композициями с *L. buchneri* DSM 22501 (Композиции 5 и 7), где был включен *L. plantarum* DSM 16568, штамм с высокой продукцией молочной кислоты.

Как показано на Фиг. 9а, Композиция 4 увеличивала аэробную стабильность по сравнению с необработанным контролем после короткого периода ферментирования в 7 суток или 14 суток. Кроме того и очень неожиданно, Композиция 4 также продемонстрировала лучшую аэробную стабильность, чем положительный контроль (Композиция 7) в оба периода времени.

Как показано на Фиг. 9б, Композиция 4 увеличивала аэробную стабильность по сравнению с необработанным контролем после 8 суток ферментации с последующими 7 сутками аэробной нагрузки. Кроме того и очень неожиданно, Композиция 4 увеличивала аэробную стабильность по сравнению с необработанным контролем даже после очень короткого периода ферментирования продолжительностью только 2 суток или 4 суток.

Как показано на Фиг. 10, наблюдали общеизвестную картину уменьшения количества дрожжей как функции от увеличенного времени ферментирования. Однако неожиданно уменьшение количества дрожжей было более значительным при использовании Композиции 4 как по сравнению с отрицательным, так и по сравнению с положительным контролем (Композиция 7) как после 2, так и после 14 суток ферментирования.

Неожиданно, как показано на Фиг. 11, уровень рН при использовании Композиции 4 был снижен до такого же уровня как в положительном контроле (Композиция 7), несмотря на отсутствие *Lactobacillus plantarum* в Композиции 4.

Следовательно, эти эксперименты показывают, что силосный инокулянт, состоящий по существу из факультативного гетероферментативного *L. buchneri* и только гомоферментативных штаммов, позволяет достичь хорошего качества корма с улучшенной аэробной стабильностью даже для силосов, открытых

после лишь короткого периода анаэробного ферментирования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Jatkauskas, J. and V. Vrotniakiene, "Evaluation of fermentation parameters, microbiological composition and aerobic *stability of grass and whole crop maize silages treated with microbial inoculants.*" *Zemdirbyste-Agriculture.*, 2013, Vol. 100, No. 2, pp. 143-150

Jatkauskas, J. et al. (2013), *The effects of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silages*, *Agricultural and Food Science*, 2013, 22, 137-144

Vandamme, B. et al, *Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics*, *Microbiological Reviews*, 1996, Vol. 60, No. 2, 407-438

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Силосный инокулянт, состоящий по существу из:

(а) по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и

(б) по меньшей мере одного вида или штамма гомоферментативных бактерий, который (1) не уменьшает рост данного по меньшей мере одного вида облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий и (2) быстро снижает рН без продуцирования избыточного количества молочной кислоты.

2. Силосный инокулянт по п. 1, где по меньшей мере один вид облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий включает вид *Leuconostoc* или *Lactobacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus reuteri*.

3. Силосный инокулянт по п. 1, где по меньшей мере один вид облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий включает *Lactobacillus buchneri*.

4. Силосный инокулянт по п. 3, где *Lactobacillus buchneri* представляет собой штамм *Lactobacillus buchneri*, депонированный как DSM 22501.

5. Силосный инокулянт по п. 1, где по меньшей мере один вид гомоферментативных бактерий включает *Enterococcus*.

6. Силосный инокулянт по п. 5, где *Enterococcus* представляет собой *Enterococcus faecium*.

7. Силосный инокулянт по п. 1, где по меньшей мере один вид гомоферментативных бактерий включает *Lactococcus*.

8. Силосный инокулянт по п. 7, где *Lactococcus* представляет собой *Lactococcus lactis*.

9. Силосный инокулянт по п. 8, где *Lactococcus lactis* представляет собой штамм, депонированный как DSM 11037.

10. Силосный инокулянт по п. 1, состоящий по существу из *Lactobacillus buchneri* и *Lactococcus*.

11. Способ получения ферментированного кормового продукта, включающий инокулирование растительного материала силосным инокулянтом по п. 1.

12. Способ по п. 11, где растительный материал инокулируют силосным

инокулянтom и инкубируют в течение периода вплоть до 7 суток.

**13.** Способ по п. 11, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтom и инкубируют в течение периода вплоть до 14 суток.

**14.** Способ по п. 11, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтom и инкубируют в течение периода вплоть до 28 суток.

**15.** Способ по п. 11, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтom и инкубируют в течение периода вплоть до 90 суток.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ****измененная на международной стадии**

**1.** Силосный инокулянт, который в качестве активных компонентов содержит только:

(а) облигатные гетероферментативные молочнокислые бактерии вида *Lactobacillus buchneri* и

(б) гомоферментативные молочнокислые бактерии по меньшей мере одного из видов *Lactococcus* и *Enterococcus*, которые не уменьшают рост (а).

**2.** Силосный инокулянт по п. 1, который содержит только *Lactobacillus buchneri* и *Lactococcus*.

**3.** Силосный инокулянт по п. 1 или п. 2, где *Lactococcus* представляет собой *Lactococcus lactis*.

**4.** Силосный инокулянт по п. 3, где *Lactococcus lactis* представляет собой штамм, депонированный как DSM 11037.

**5.** Силосный инокулянт по любому из пп. 1-4, где *Lactobacillus buchneri* представляет собой штамм *Lactobacillus buchneri*, депонированный как DSM 22501.

**6.** Силосный инокулянт по любому из пп. 1 или 3-5, где *Enterococcus* представляет собой *Enterococcus faecium*.

**7.** Способ получения ферментированного кормового продукта, включающий инокулирование растительного материала силосным инокулянтом по любому из пп. 1-6.

**8.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 2 суток.

**9.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 4 суток.

**10.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 7 суток.

**11.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 8 суток.

**12.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 14 суток.

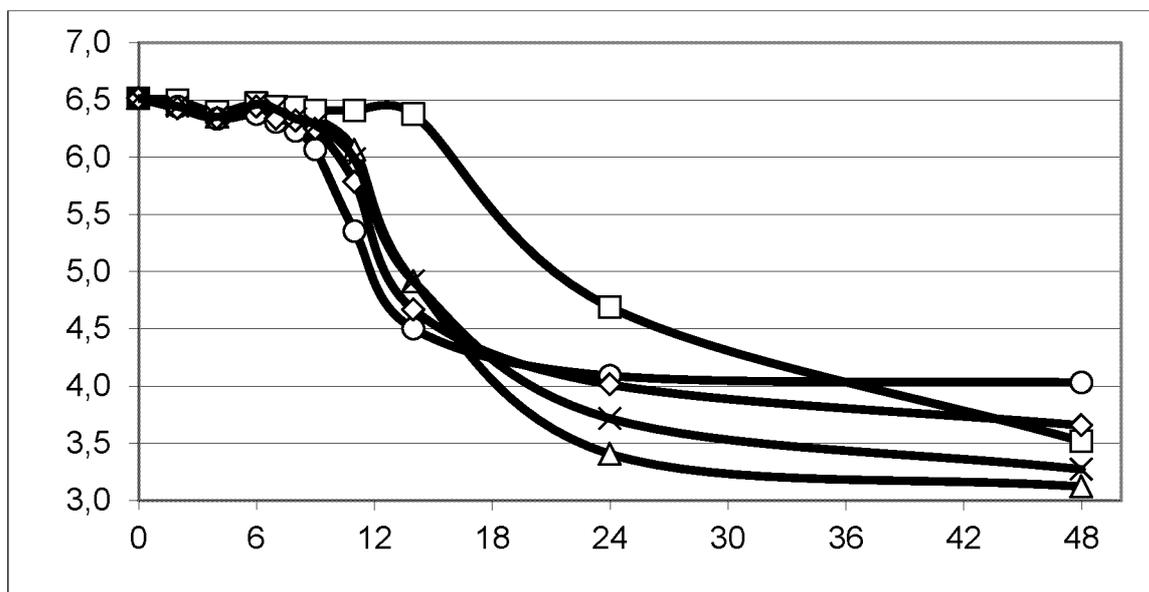
**13.** Способ по п. 7, где расти

тельный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 28 суток.

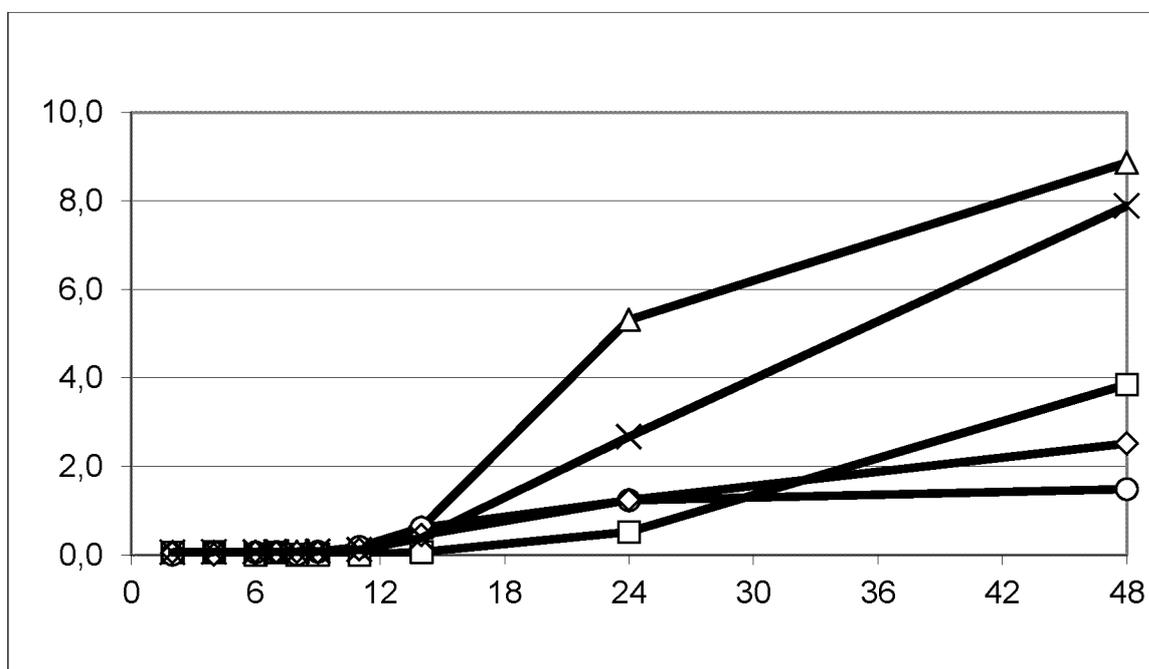
**14.** Способ по п. 7, где растительный материал инокулируют силосным инокулянтом и инкубируют в течение периода вплоть до 90 суток.

1 Улучшенные композиции гетеро- и гомоферментативных видов молочнокислых бактерий для консервирования силоса с двойным эффектом

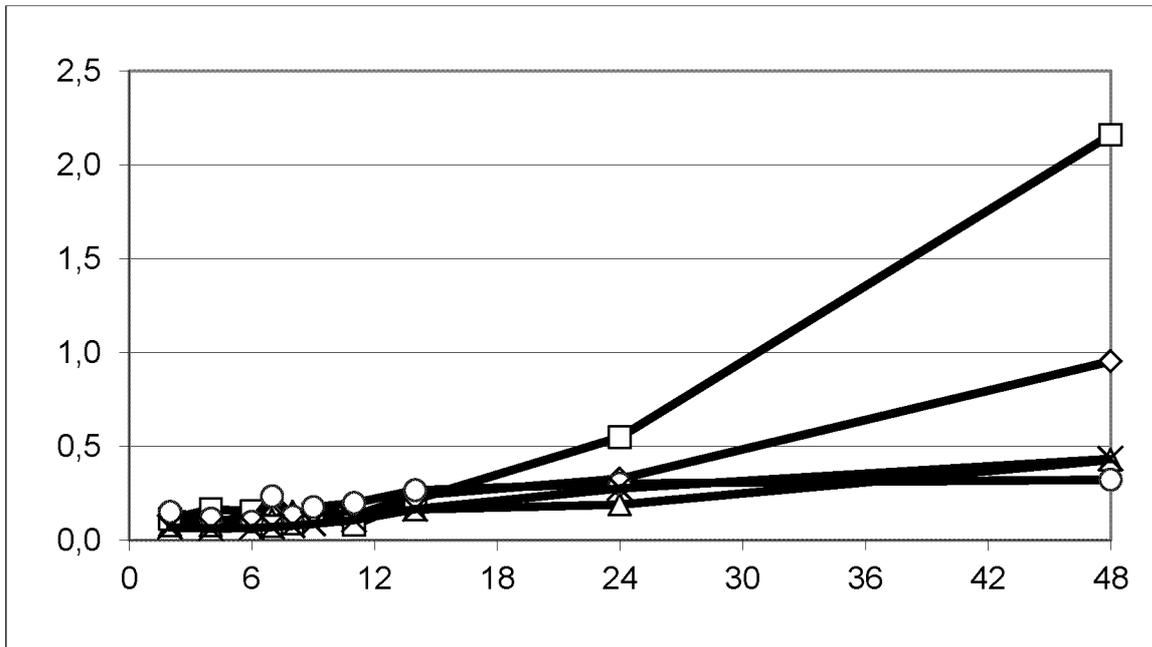
Фиг. 1а



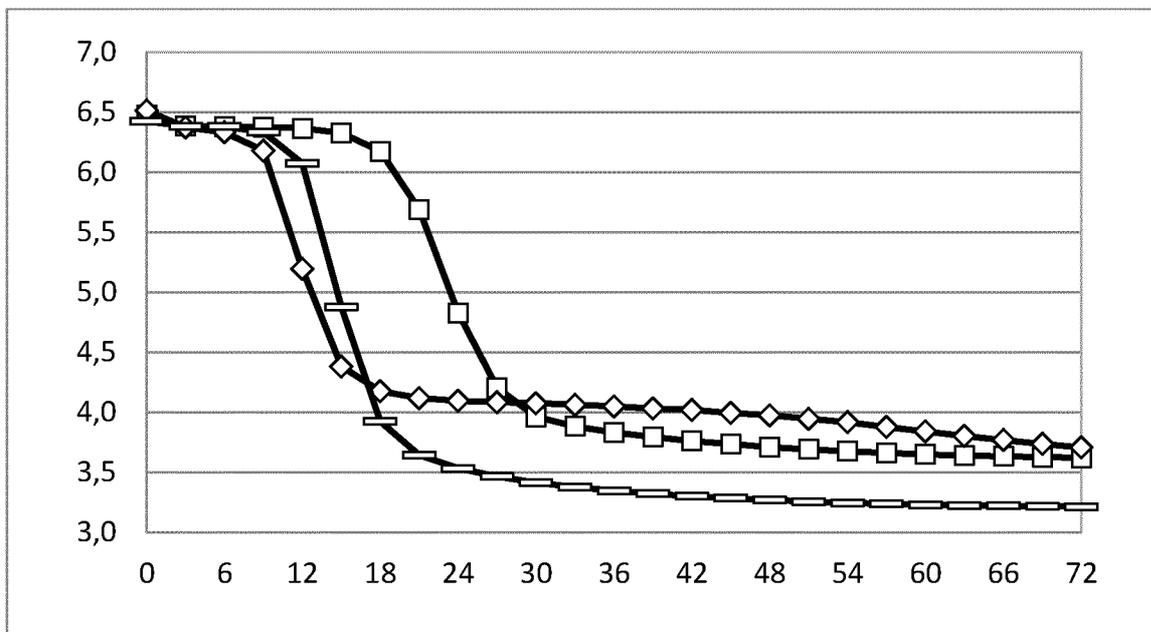
Фиг. 1б



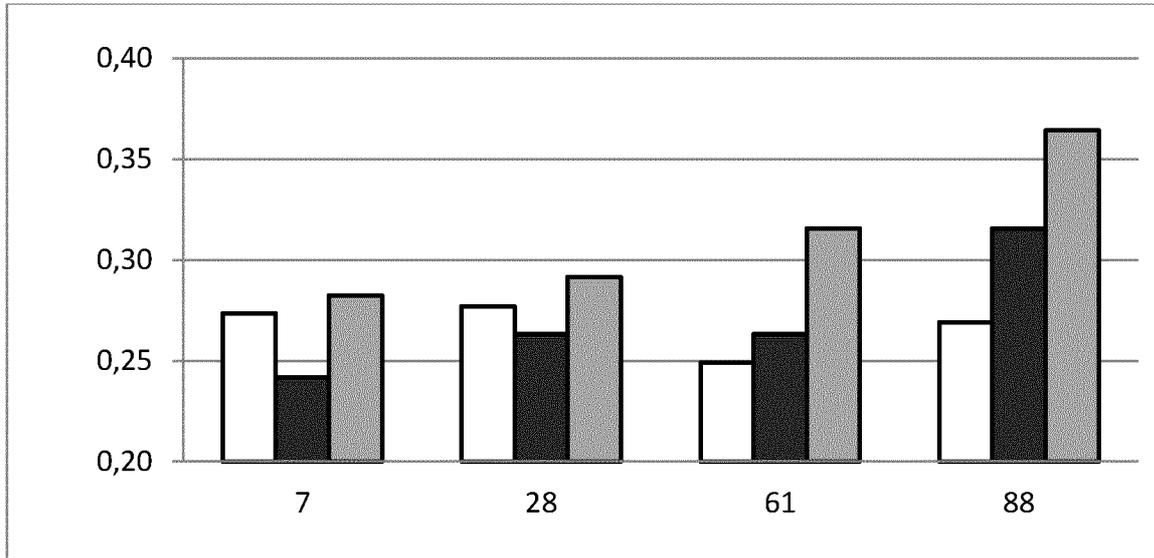
Фиг. 1в



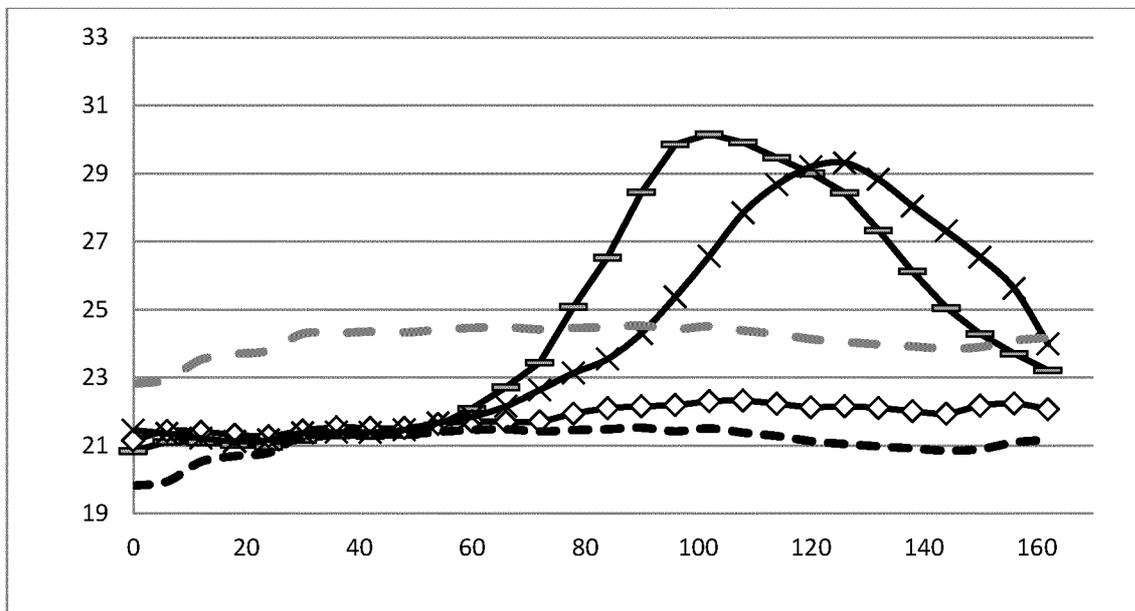
Фиг. 2



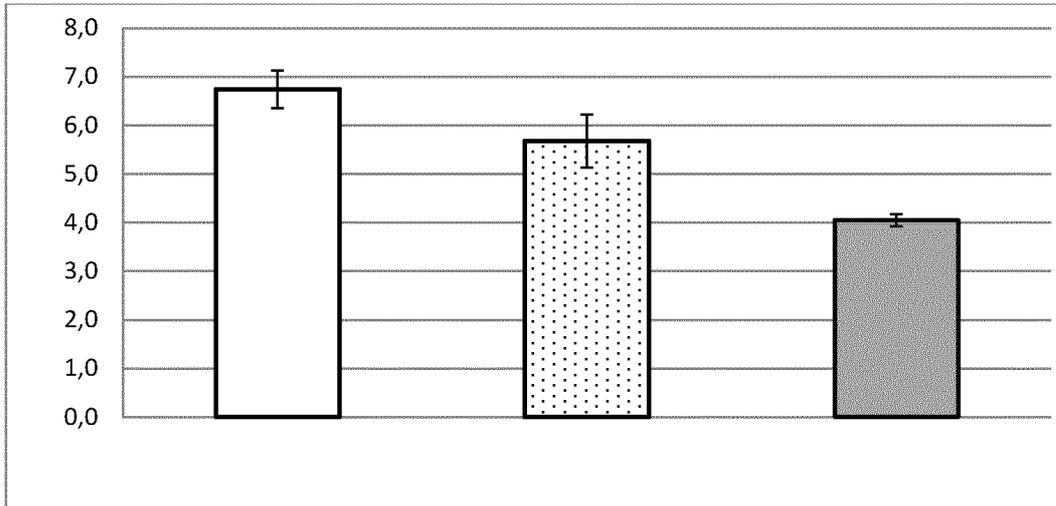
Фиг. 3



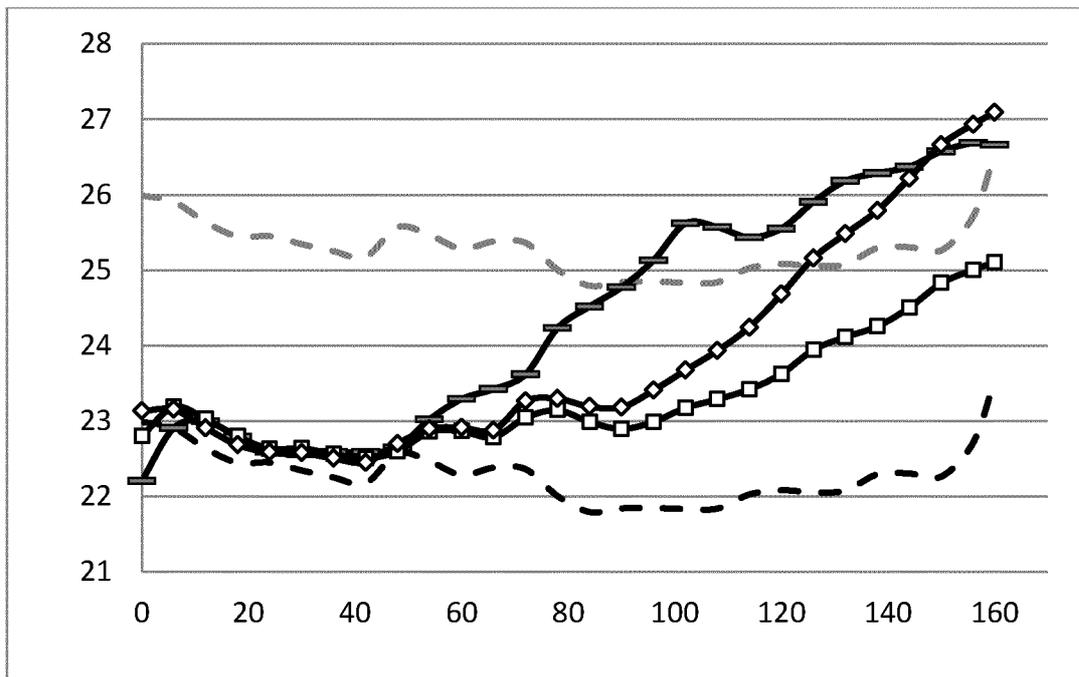
Фиг. 4



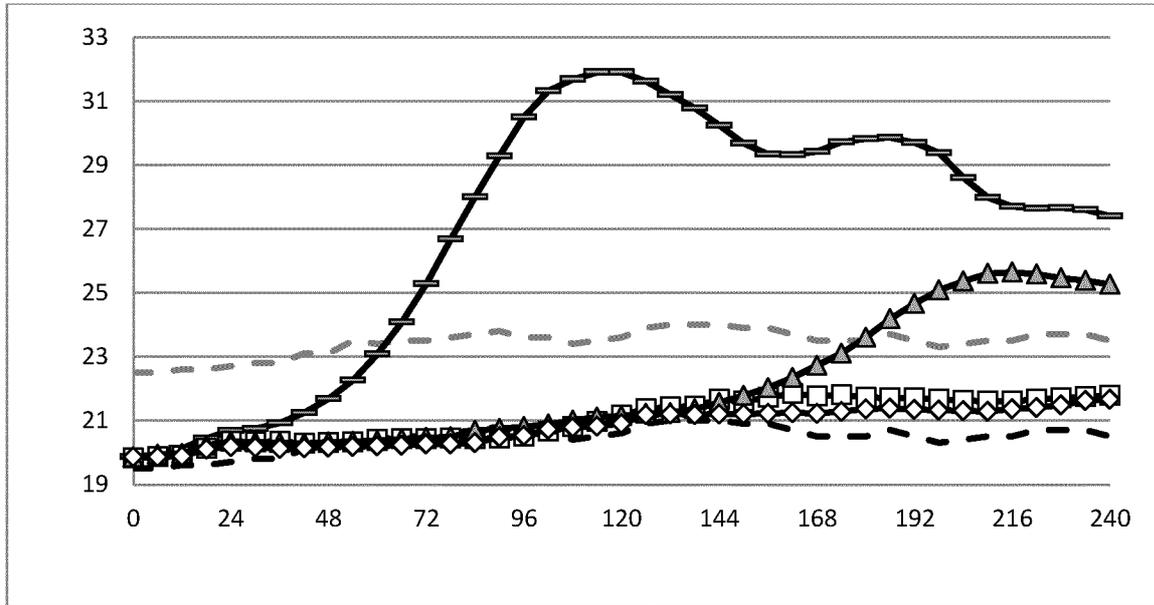
Фиг. 5



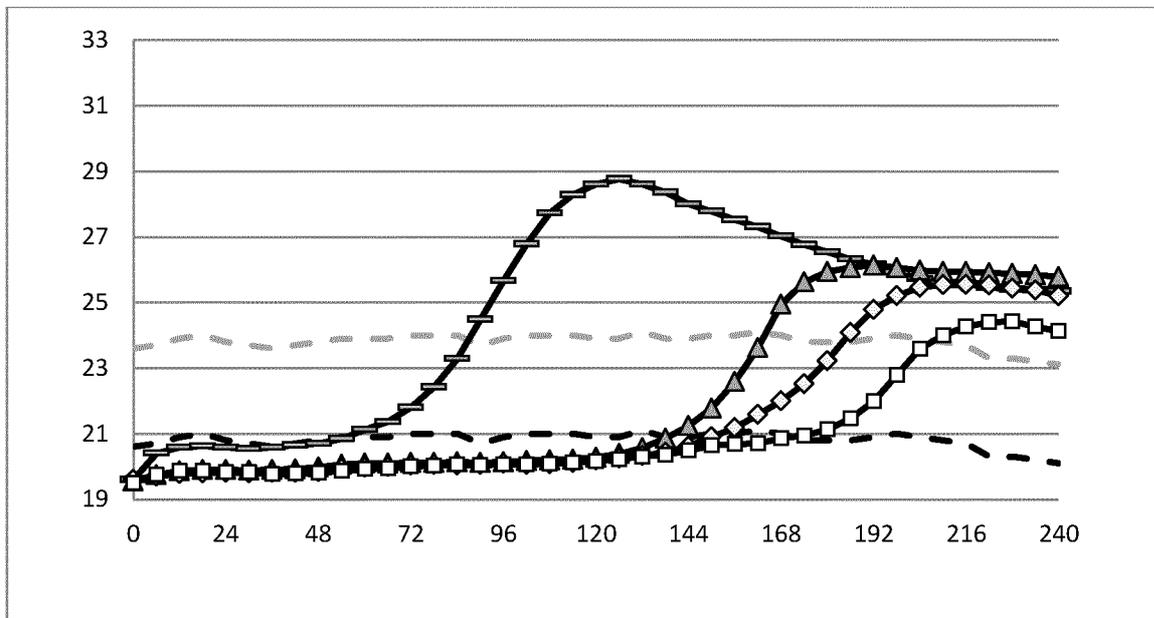
Фиг. 6



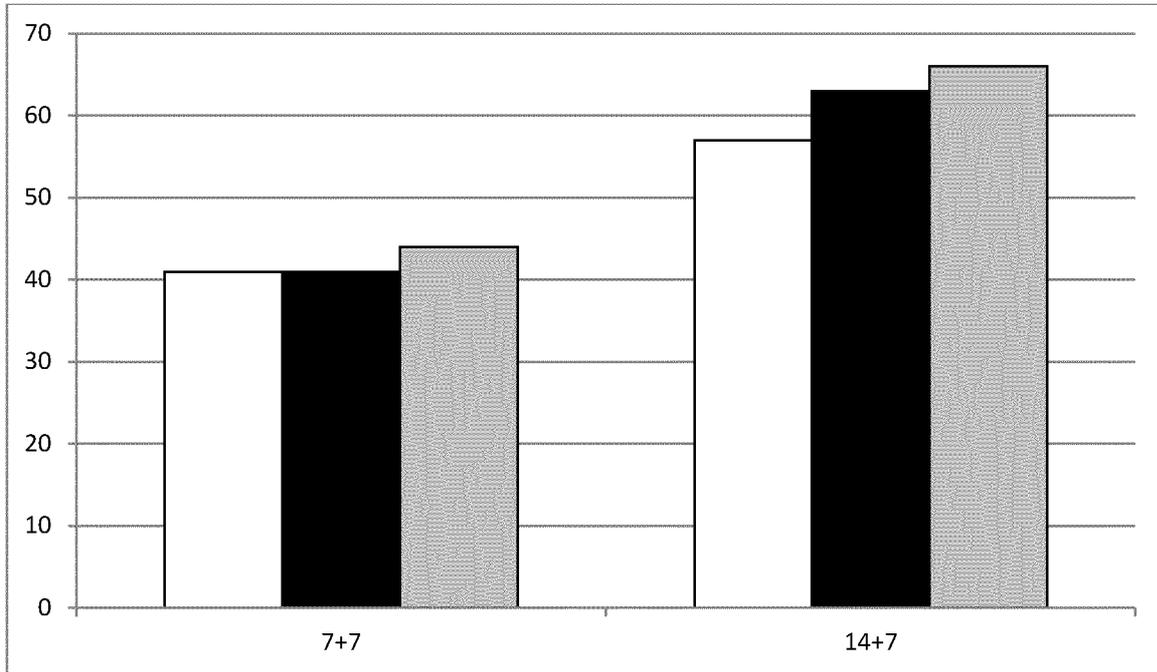
Фиг. 7



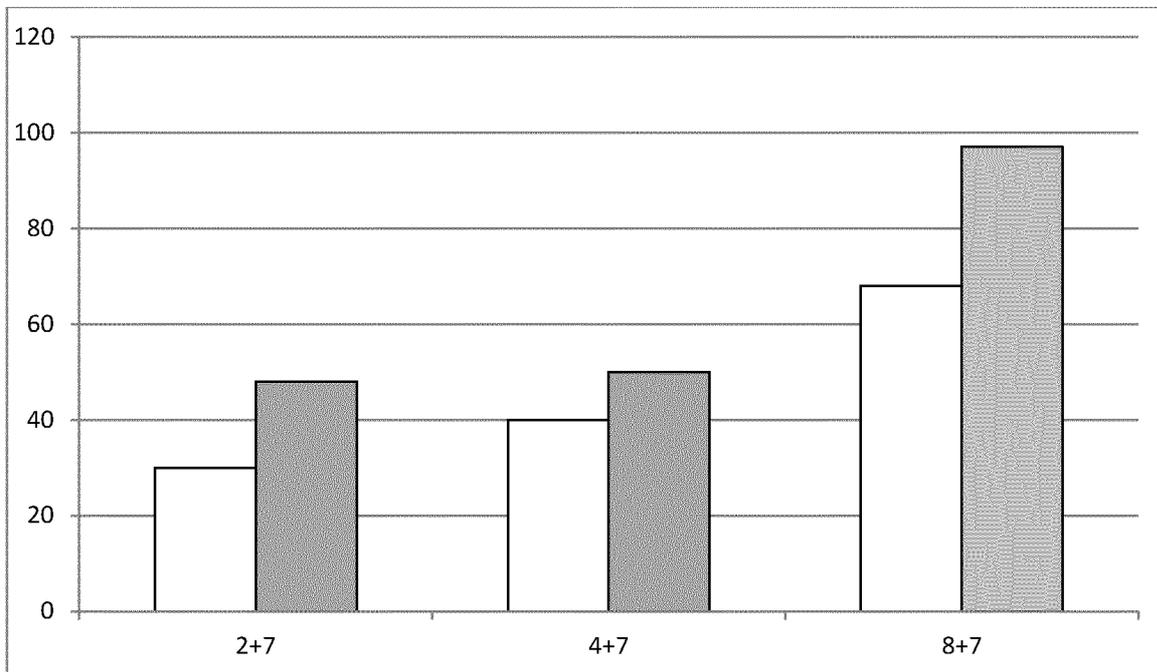
Фиг. 8



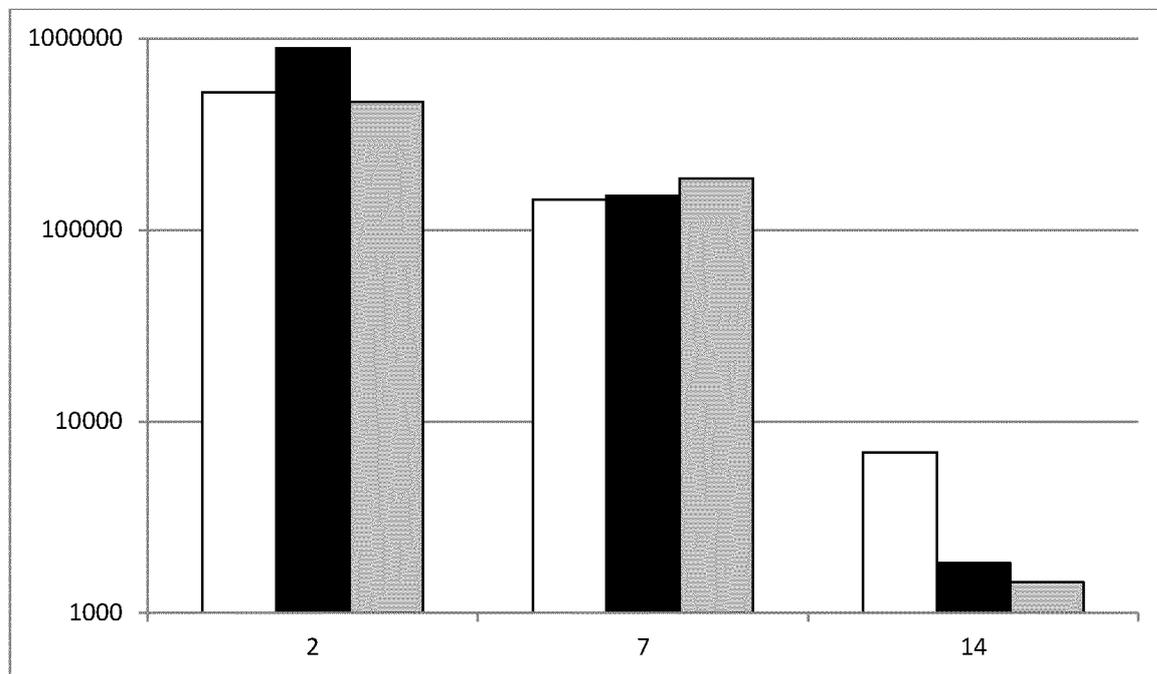
Фиг. 9а



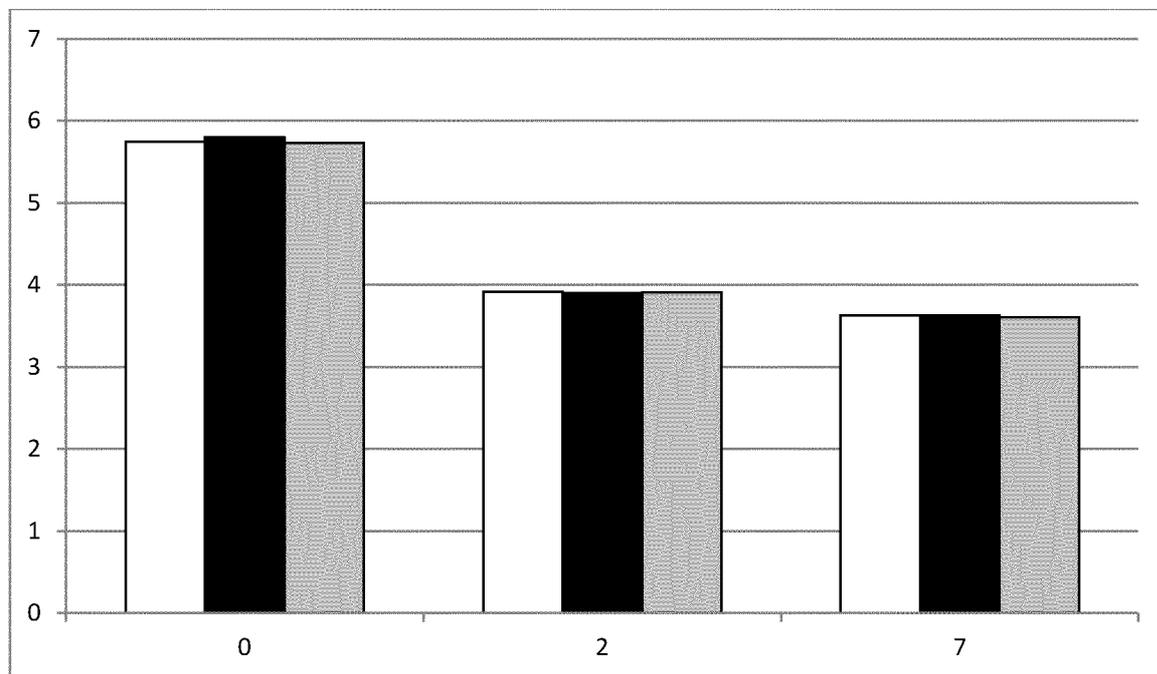
Фиг. 9б



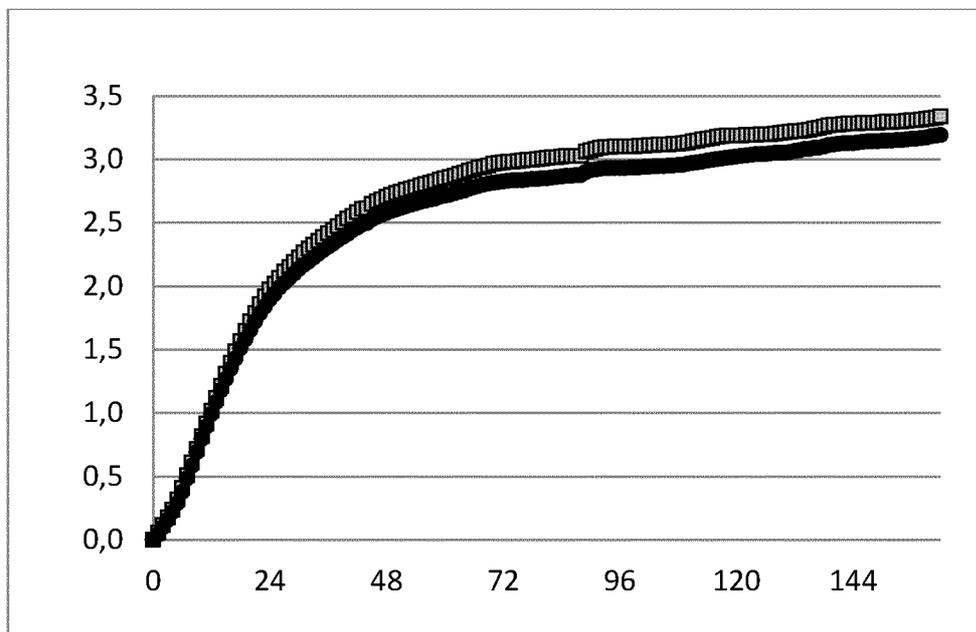
Фиг. 10



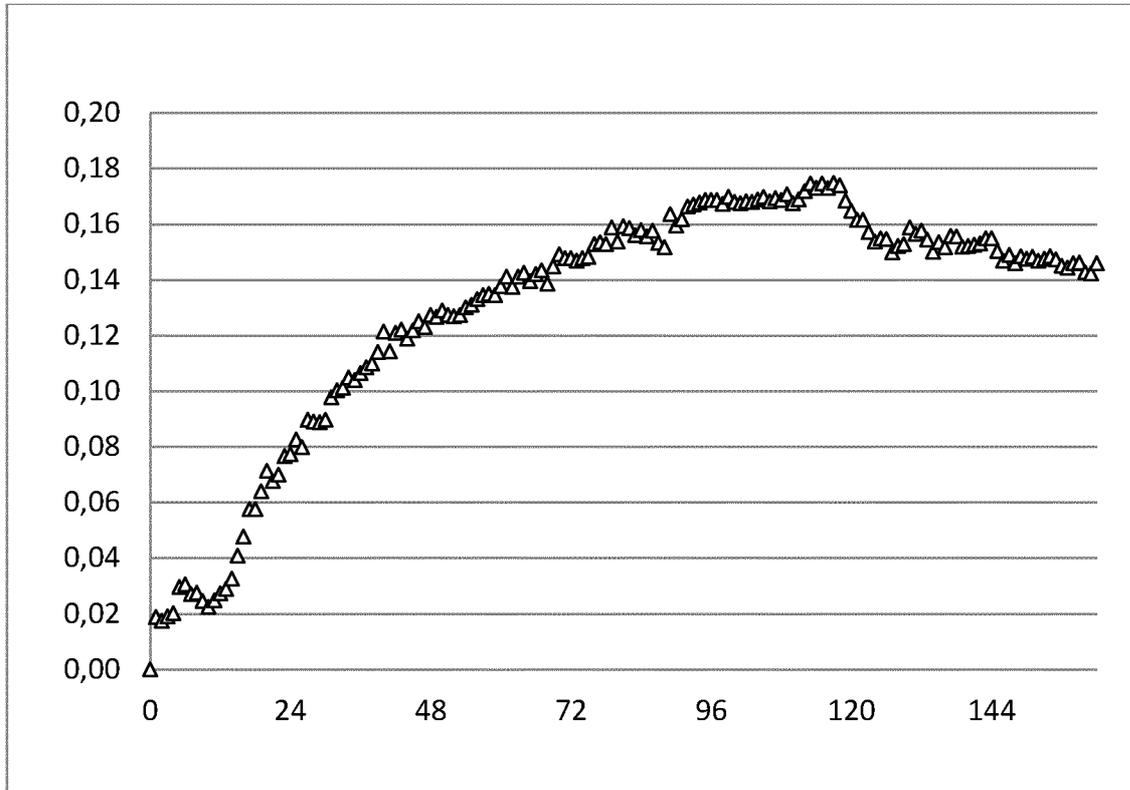
Фиг. 11



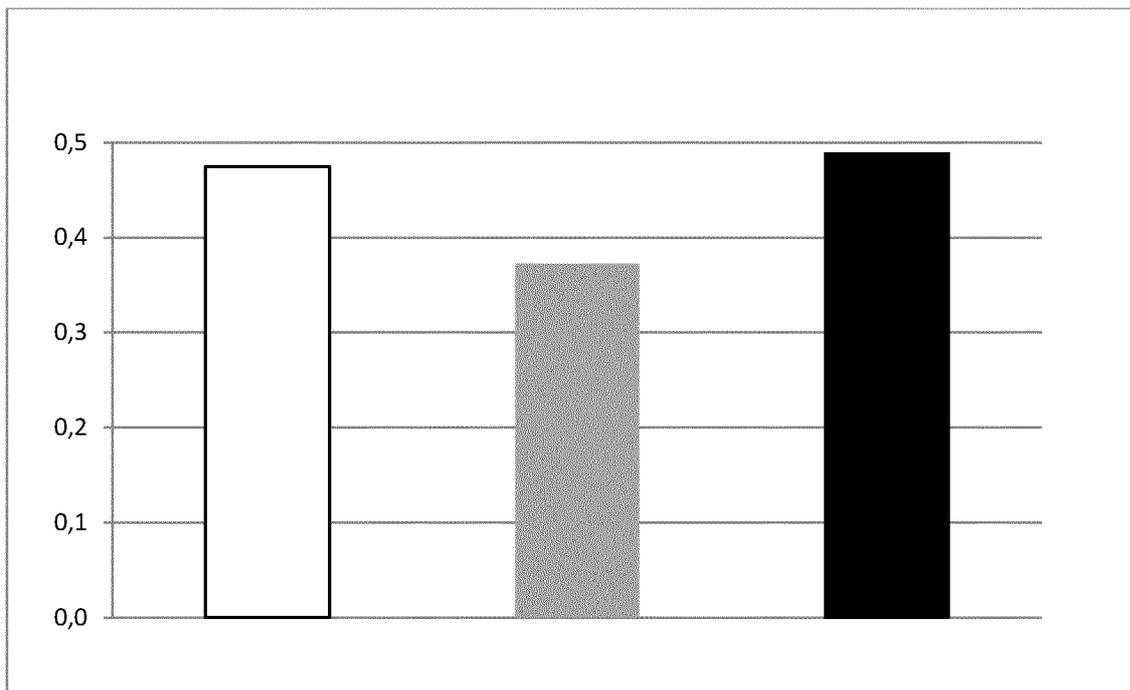
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

