



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.12

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791141

(22) Дата подачи заявки
2015.11.24

(54) КОНСЕРВАНТ ДЛЯ СЕНА И СПОСОБЫ КОНСЕРВАЦИИ СЕНА

(31) 14194567.5

(32) 2014.11.24

(33) EP

(43) 2017.10.31

(86) PCT/IB2015/059079

(87) WO 2016/083996 2016.06.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДАНСТАР ФЕРМЕНТ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Синду Жульен, Дюран Энри (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BRURBERG M.B. ET AL.: "Expression of a chitinase gene from *Serratia marcescens* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*", APPL MICROBIOL BIOTECHNO, vol. 42, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 108-115, XP055184211, page 108 - page 114

OLSTORPE M. ET AL.: "Pichia anomala yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions", ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 156, no. 1-2, 28 February 2010 (2010-02-28), pages 47-56, XP026895076, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2009.12.008 [retrieved on 2010-01-13] page 47 - page 56

PETERSSON S. ET AL.: "BIOCONTROL OF MOLD GROWTH IN HIGH-MOISTURE WHEAT STORED UNDER AIRTIGHT CONDITIONS BY PICHIA ANOMALA, PICHIA GUILLIERMONDII, AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 61, no. 3, 1 March 1995 (1995-03-01), pages 1027-1032, XP001120388, ISSN: 0099-2240, page 1027 - page 1032

ZAHIRODDINI H. ET AL.: "Effects of Microbial Inoculants on the Fermentation, Nutrient Retention, and Aerobic Stability of Barley Silage", ASIAN-AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES, vol. 19, no. 10, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 1429-1436, XP055171970, page 1429 - page 1430

EP-A2-0408220

WEINBERG Z.G. ET AL.: "NEW TRENDS AND OPPORTUNITIES IN THE DEVELOPMENT AND USE OF INOCULANTS FOR SILAGE", FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 19, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 53-68, XP000960647, ISSN: 0168-6445, DOI: 10.1016/0168-6445(96)00025-3, page 56 - page 64

US-A-4820531

MEHMET LEVENT OZDUVEN ET AL.: "Bakteriyal inokulantlar ve/veya Enzimlerin Triticale Silajlarında Fermantasyon, Aerobik Stabilitate ve in vitro Kuru ve Organik Madde Sindirilebilirliği Uzerine Etkileri", KAFKAS UNIVERSITESI VETERINER FAKULTESI DERGISI, 1 January 2009 (2009-01-01), XP055184339, ISSN: 1300-6045, DOI: 10.9775/kvfd.2009.1628, page 752 - page 755

ULRIKA DRUVEFORS ET AL.: "Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 2, 19 April 2002 (2002-04-19), pages 389-394, XP055184359, abstract

STINA PETERSSON ET AL.: "Pichia anomala as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight conditions", POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY, vol. 15, no. 2, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 175-184, XP055184361, ISSN: 0925-5214, DOI: 10.1016/S0925-5214(98)00081-7, abstract

TENDERDY R.P.: "ENSILING ALFALFA WITH ADDITIVES OF LACTIC ACID BACTERIA AND ENZYMES", JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, WILEY & SONS, CHICHESTER, GB, vol. 55, no. 2, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 215-228, XP000215852, ISSN: 0022-5142, abstract

(57) Предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью либо отдельно, либо в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia* или бактерий рода *Pediosoccus*. Также предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его сохранения,

где способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество дрожжей рода *Pichia*.

034723 B1

034723 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее описание относится к консерванту для сена. В частности, к консерванту для сена, предназначенному для консервации сена с высоким содержанием влаги, и к способу использования консерванта для сена для консервации предназначенного для хранения сена с высоким содержанием влаги.

Уровень техники

Провяливание сена до оптимального уровня влажности на поле перед прессованием в тюки было бы оптимальным для уменьшения потери сухого вещества (СВ), роста плесени и дыхания растительных клеток во время прессования в тюки и хранения сена. Однако этот процесс приводит к значительным потерям питательных веществ из-за продолжающегося дыхания растений, разрушения листьев от механических повреждений и из-за выщелачивания во время дождя. Признание этого факта, а также непредсказуемые погодные условия заставляют многих производителей сена упаковывать сено повышенной, относительно оптимальной влажности (20-30%), чтобы свести к минимуму риск порчи от дождя и потери листьев от механических повреждений. Однако эта практика приводит к потерям, вызванным активностью дрожжей и плесени, а иногда и бактерий и, как результат, нагреванием сена, и к низкой питательной ценности сена к моменту его использования в качестве корма для животных.

Одним из простых подходов является распыление на влажное сено во время его хранения органической кислоты, например пропионовой. Несмотря на то, что органические кислоты, как правило, эффективны в предотвращении размножения грибов в сыроватом сене, более высокие уровни нанесения, увеличенное поле, затраты на обработку, а также экологические проблемы приводят к тому, что большинство производителей сена неохотно пользуются такими методами.

Хотя согласно результатам проведенных исследований органические кислоты, используемые для консервации сена, спрессованного в тюки при содержании влаги, выше оптимального уровня, могут быть потенциально заменены инокулянтами на основе бактерий (Baah et al., *Asia-Aust. J. Anim. Sci.*, 18: 649-660, 2005), результаты других исследований силоса и сенажа были противоречивыми (Zahiroddini et al., *Asia-Aust. J.* 19: 10: 1429-1436, 2006, Muck, *Trans. ASAE* 47: 1011-1016, 2004). Существует множество свидетельств того, что выявленное несоответствие в ответах на инокулянты обусловлено взаимодействием между организмами разных видов в отдельных инокулянтах и популяциями эпифитных микробов (бактерий, дрожжей и плесени), содержащихся в сене до инокуляции.

Было бы желательно предоставить улучшенный консервант для сена, в частности для предотвращения и уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги во время его хранения в результате теплового воздействия, а также для его консервации.

Сущность изобретения

Настоящее раскрытие предоставляет способ сохранения качества сена с высоким содержанием влаги во время его хранения. Способ основан на использовании консерванта для сена, способного предотвращать и/или уменьшать порчу сена с высоким содержанием влаги во время его хранения в результате теплового воздействия. Используемый консервант для сена предотвращает и/или уменьшает нагревание сена с высоким содержанием влаги настолько же эффективно или лучше, чем органические кислоты.

В одном из аспектов предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью либо отдельно, либо в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения их нагревания количеством дрожжей рода *Pichia* или бактерий рода *Pediococcus*. В другом аспекте предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью.

В другом аспекте предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения их нагревания количеством дрожжей рода *Pichia*.

В другом аспекте предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения их нагревания количеством бактерий рода *Pediococcus*.

В другом аспекте предложен способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации, причем этот способ включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для

консервации сена и уменьшения его нагревания количество дрожжей рода *Pichia*.

В следующем аспекте представлен консервант для сена, содержащий эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью.

В еще одном дополнительном аспекте предложен консервант для сена, содержащий эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia* или бактерии рода *Pediosoccus*.

В другом дополнительном аспекте предложен консервант для сена, содержащий эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia*.

В другом аспекте предложен консервант для сена, содержащий эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством бактерии рода *Pediosoccus*.

В еще одном аспекте все вышеупомянутые аспекты могут дополнительно содержать по меньшей мере один фермент, имеющий пектин-лиазную активность, глюканиазную активность или их смесь.

В другом аспекте предоставляется консервант для сена, содержащий эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество дрожжей рода *Pichia*.

В еще одном аспекте предоставляется сено с высоким содержанием влаги, содержащее либо только эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество дрожжей по меньшей мере одного фермента с хитиназной активностью, либо в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia* или бактерий рода *Pediosoccus*. Сено с высоким содержанием влаги может дополнительно содержать по меньшей мере один фермент, имеющий пектин-лиазную активность, глюканиазную активность или их смесь.

В другом аспекте предоставляется сено с высоким содержанием влаги, содержащее эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество дрожжей рода *Pichia*.

Краткое описание чертежей

После приведенного в общем виде описания сущности изобретения далее дается описание сопроводительных чертежей, иллюстрирующих предпочтительный вариант осуществления, где

на фиг. 1 показана средненедельная температура хранения тюков сена люцерны, обработанных дрожжами рода *Pichia* (*P. anomala*) или по меньшей мере одним ферментом с хитиназной активностью (фермент), по сравнению с тюками сена люцерны, обработанных и не обработанных пропионовой кислотой (проп. кислота);

на фиг. 2 показана среднесуточная температура во время хранения тюков сена люцерны, обработанных по меньшей мере одним ферментом с хитиназной активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia* (*PichChit*) или бактерий рода *Pediosoccus* (*Pedio pe*), по сравнению с тюками сена люцерны, обработанными и не обработанными пропионовой кислотой (проп. кислота);

на фиг. 3 приведена диаграмма сравнения времени (в мин), в течение которого во время хранения (2012) тюки сена находились при температуре выше 40°C, для тюков люцерны, обработанных по меньшей мере одним ферментом с хитиназной активностью в комбинации с дрожжами рода *Pichia* (*Pichia*+ферм.) или бактериями рода *Pediosoccus* (*Pedio*+ферм.), и тюков сена люцерны, обработанных пропионовой кислотой (проп. кислота) и не обработанных пропионовой кислотой (контроль); и

на фиг. 4 приведена диаграмма сравнения времени (в мин), в течение которого во время хранения (2013) тюки сена находились при температуре выше 40°C, для тюков сена люцерны, обработанных по меньшей мере одним ферментом с хитиназной активностью в комбинации с дрожжами рода *Pichia* (*Pichia*+ферм.) или бактериями рода *Pediosoccus* (*Pedio*+ферм.), и тюков сена люцерны, обработанных только дрожжами рода *Pichia* (*Pichia*), бактериями рода *Pedioscicularone* (*Pedio*), пропионовой кислотой (проп. кислота) и не обработанные пропионовой кислотой (контроль).

Подробное описание изобретения

Одной из проблем, возникающих в случае сена с высоким содержанием влаги, является его порча и гниение, вызываемые спонтанным выделением тепла. Такие нагретые тюки обычно имеют более бледный цвет, меньшую питательную ценность и более заметную плесень. Один из подходов заключается в распылении на сыроватое сено во время его хранения органической кислоты, такой как, например, пропионовая кислота. Несмотря на то, что органические кислоты, как правило, эффективны в предотвращении размножения грибов во влажном сене, более высокие уровни нанесения, увеличенное поле, затраты на обработку, а также экологические проблемы приводят к тому, что большинство производителей сена неохотно пользуются такими методами.

Хотя согласно результатам проведенных исследований, органические кислоты, используемые для консервации сена, спрессованного в тюки при содержании влаги, выше оптимального уровня, могут

быть потенциально заменены инокулянтами на основе бактерий, результаты других исследований силоса и сенажа были противоречивыми. Существует множество свидетельств того, что выявленное несоответствие в ответах на инокулянты обусловлено взаимодействием между организмами разных видов в отдельных инокулянтах и популяциями эпифитных микробов (бактерий, дрожжей и плесени), содержащихся в сене до инокуляции.

В самом широком аспекте настоящее раскрытие предоставляет способ сохранения качества сена и предотвращения или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги во время его хранения в результате теплового воздействия, причем способ включает обработку свежего сена консервантом для сена в аэробных условиях.

Консервант для сена содержит эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназой активностью. Неожиданно было обнаружено, что консервирующее действие консерванта для сена и его способность предотвращать и/или уменьшать порчу сена с высоким содержанием влаги во время его хранения в результате теплового воздействия еще более усиливается в случае комбинирования по меньшей мере одного фермента с хитиназой активностью с дрожжами рода *Pichia* или бактериями рода *Pediosoccus*. Когда по меньшей мере один фермент с хитиназой активностью объединен с дрожжами рода *Pichia* или бактериями рода *Pediosoccus*, то, как видно на фиг. 4, температура сена с высоким содержанием влаги значительно уменьшается по сравнению с использованием каждого компонента комбинации по отдельности.

Альтернативно, консервант для сена может содержать только дрожжи рода *Pichia* в количестве, эффективном для консервации сена и уменьшения его нагревания.

Используемый в настоящем описании термин "эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество" относится к количеству, которое является, по меньшей мере, достаточным для сохранения качества сена. Таким образом, количество является, по меньшей мере, достаточным для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации.

Используемый в настоящем описании термин "сено" следует понимать как относящийся ко всем формам сена, поскольку этот термин обычно используется в сельском хозяйстве. Сено чаще всего состоит из люцерны, травы или смесей люцерны и травы, собранной при целевом уровне влаги ниже 20%.

Способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназой активностью. Как упоминалось ранее, по меньшей мере один фермент с хитиназой активностью может быть объединен с дрожжами рода *Pichia* или бактериями рода *Pediosoccus*.

В одном из вариантов осуществления способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназой активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения его нагревания количеством дрожжей рода *Pichia*.

В другом варианте осуществления способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество по меньшей мере одного фермента с хитиназой активностью в комбинации с эффективным для консервации сена и уменьшения их нагревания количеством бактерий рода *Pediosoccus*.

Альтернативно, способ обработки сена для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, а также для его консервации включает добавление в сено консерванта для сена, содержащего эффективное для консервации сена и уменьшения его нагревания количество только дрожжей рода *Pichia*.

Дрожжи рода *Pichia* включают, без ограничения, *Pichia anomala* sp. В одном из вариантов осуществления дрожжи рода *Pichia* могут представлять собой *Pichia anomala* sp., имеющие все отличительные характеристики штамма *Pichia anomala* с номером доступа DBVPG 3003. Понятно, что речь идет о любом изоляте, имеющем отличительные признаки штамма *Pichia anomala* с номером доступа DBVPG 3003, включая его субкультуры и варианты, которые имеют указанные отличительные признаки и активность. Штамм *Pichia anomala* с номером доступа DBVPG 3003 депонирован в промышленной коллекции дрожжей DBVPG в *Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientale Zootechniche, Sezione di Microbiologia Agroalimentare ed Ambientale*, <http://www.agr.unipg.it/dbvpg>, Университет Перуджии, Италия.

Бактерии рода *Pediosoccus* включают, без ограничения, *Pediosoccus pentosaceus* sp. В варианте осуществления бактерии рода *Pediosoccus* могут представлять собой *Pediosoccus pentosaceus* sp, имеющие все отличительные признаки штамма *Pediosoccus pentosaceus* BTC328 (с номером доступа NCIMB 12674). В другом варианте осуществления бактерии рода *Pediosoccus* могут представлять собой *Pedio-*

coccus pentosaceus sp, имеющие все отличительные характеристики штамма *Pediococcus pentosaceus* BTC401 (с номером доступа NCIMB 12675). Понятно, что речь идет о любом изоляте, имеющем отличительные характеристики штамма *Pediococcus pentosaceus* BTC328 или BTC401, включая их субкультуры и варианты, которые имеют указанные отличительные признаки и активность, как раскрыто в настоящем описании. Штаммы *Pediococcus pentosaceus* с номерами доступа NCIMB 12674 и 12675 были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA.

В одном из вариантов осуществления способа для обработки сена обычно используется количество от 10^5 до 10^{15} жизнеспособных организмов дрожжей или бактерий на 1 т сена, предпочтительно от 10^7 до 10^{13} жизнеспособных организмов дрожжей или бактерий на 1 т сена и более предпочтительно от 10^9 до 10^{12} жизнеспособных организмов дрожжей или бактерий на 1 т сена. Используемый в настоящем описании термин "тонна" следует понимать как относящийся к метрической тонне (1000 кг).

По меньшей мере один фермент с хитиназной активностью может иметь хитиназную активность в диапазоне от примерно 6 до примерно 300 единиц (U) активности фермента на 1 т подлежащего обработке сена. В одном из вариантов осуществления хитиназная активность может находиться в диапазоне от примерно 6 до примерно 100 U на 1 т подлежащего обработке сена. Единичное значение U определяется как количество фермента, обеспечивающее определенное количество хитиназной активности. Каждая единица (U) активности фермента может высвобождать около 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозамина из хитина (г) в час при pH 6,0 и при температуре 25°C в течение 2 ч анализа.

Консервант для сена согласно настоящему описанию может дополнительно содержать по меньшей мере один фермент с пектин-лиазной активностью, глюканазной активностью или их смесь.

Консервант для сена согласно настоящему описанию может находиться либо в жидкой, либо в твердой форме. Консервант для сена согласно настоящему описанию может содержать подходящий носитель или может быть использован в том виде, в котором он представлен. В твердой форме консервант для сена может содержать твердые носители или физические наполнители. Подходящий носитель может быть в жидкой форме на основе воды или в жидкой форме, не содержащей воду, или в твердой форме. Неограничивающие примеры носителя в жидкой форме на основе воды или в жидкой форме, не содержащей воду, включают воду, масла и парафин.

Неограничивающие примеры носителей в твердой форме включают органический или неорганический носитель, такой как, например, мальтодекстрин, крахмалы. Твердая форма может наноситься непосредственно на сено путем напыления легкого порошка или путем опрыскивания сена, если находится в жидком носителе. Понятно, что для целей настоящего описания может использоваться любой другой подходящий носитель. Также понятно, что консервант для сена в соответствии с настоящим изобретением может быть нанесен на сено стандартными методами, обычно используемыми специалистами в данной области техники. Консервант для сена также можно наносить до, во время и/или после прессования сена в тюки. Настоящее изобретение будет более понятным из приведенных ниже примеров, которые приведены для иллюстрации изобретения, а не для ограничения его объема.

Примеры

Пример 1. Сено, условия обработки и прессование в тюки.

Использовали сено третьего покоса, состоящее из 90% люцерны и 10% травы. Сено косили дисковой косой New-Holland™ 17 сентября 2011 г. и оставляли для сушки, не проводя обработку и без ворошения. Уровень влажности оценивали с помощью прибора для определения уровня влажности сена Farmex™ (1205 Danner Drive, Aurora, OH) через пять дней после покоса, который находился в диапазоне от 20 до 35%. В это же время готовили консерванты для сена путем предварительного взвешивания инокулянтов и смешивания каждого инокулянта в отдельной емкости, содержащей 6,5 л предварительно измеренной дистиллированной воды, а затем встряхивали в течение 1 мин. Емкость распылителя и штангу с распыляющими насадками с одним соплом устанавливали на большой квадратный сенной пресс 4790 Hesston. Шланг размещали таким образом, чтобы распыление покрывало 90% валка с минимальным дрейфом.

Для определения времени, требуемого для завершения нанесения добавки на один тюк, а также для более точного определения уровня влажности прессованного в тюки материала было изготовлено два испытательных тюка. Уровень влажности тюка определяли, используя зонд для сена. Среднее время изготовления одного тюка (0,91 м × 1,22 м × 2,44 м) оказалось равным 2 мин 30 с, а средний вес тюка составлял 820 кг. Количество наносимого *P. anomala* было равно 10^{11} КОЕ/л на 1 т сена. Фермент с хитиназной активностью наносили в количестве 1,5 г (суспендированных в 1 л воды) на 1 т сена, что соответствует примерно 6 ед. на 1 т сена. Продукт пропионовой кислоты, состоящий на 68% (об./об.) из пропионовой кислоты, наносили с концентрацией 2,72 л/т и использовали в качестве положительного контроля. Отрицательным контролем служила вода, которую наносили с концентрацией 1 л на 1 т сена. *P. anomala* и фермент с хитиназной активностью были приобретены в компании Lallemand Specialities Inc. (Milwaukee, WI, USA), а пропионовая кислота была приобретена в компании Wausau Chemical Corporation (Wausau, WI, USA). Для каждого вида обработки было изготовлено по пять тюков. После каждой обработки

брали образцы *P. anomala* для проверки жизнеспособности и определения количества организмов. Эту процедуру выполняли для подтверждения количества, нанесенных организмов. Каждый тюк маркировали сразу же после его выхода из пресса, используя аэрозольную краску, после чего маркировали с помощью бирок, которые прикрепляли пластиковыми хомутиками. Все тюки взвешивались через день после прессования в тюки и взятия образцов с помощью бура. Для уменьшения риска возгорания тюки после прессования оставляли в поле на 2 недели перед их транспортировкой и закладкой на хранение в один слой в открытом с одной стороны сарае. На день 90 из тюков снова брали с помощью бура образцы с 4 сторон (исключая верхнюю и нижнюю части тюков), и перекладывали их наверх (стопки из двух тюков). На день 180 снова брали образцы с помощью бура.

Определение химических и микробиологических показателей.

Выполняли химический и микробиологический анализы образцов сена, взятых с шести различных участков поля, и композитных образцов, полученных с помощью бура, из четырех разных мест каждого тюка в дни хранения 1, 90 и 180. Для подсчета общего количества бактерий, бактерий, продуцирующих молочную кислоту (МКБ), дрожжей и плесени использовали процедуры, описанные у McAllister et al. (1995. Intake, digestibility and aerobic stability of barley silage inoculated with mixtures of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. *Can. J. Anim. Sci.* 75:425-432). Сухое вещество (СВ), органическое вещество (ОВ) и сырой протеин (СП) определяли согласно процедурам АОАС (1990), а нейтральное детергентное волокно (НДВ), кислотное детергентное волокно (КДВ) и кислотный детергентный нерастворимый азот (КДНА) определяли методами, описанными у Van Soest et al. (1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597).

Таблица 1

Химический состав (СВ, %), рН и микробиологический состав (КОЕ, \log_{10}) сена через 90 дней после обработки различными консервантами для сена во время прессования в тюки¹

Фактор ²	День 0	РА	СЕ	ВРА	CON
СВ	81,95	87,32	86,59	86,08	84,68
рН	6,25	6,11	6,24	6,00	6,36
ТВ	-	7,14	6,60	6,10	7,51
ЛАВ	3,80	5,42 ^{bc}	4,77 ^c	4,88 ^c	6,29 ^a
Дрожжи	6,48	5,57	5,94	5,38	6,20
Плесень	5,41	5,25	5,18	4,77	5,34
ОВ	87,89	88,10 ^a	85,28 ^c	88,27 ^a	88,02 ^a
NH ₃ , мг/кг	0,336	0,479	0,841	0,583	1,017
ОА	3,5	3,46	3,67	3,58	3,55
МК, (г/кг)	-	0,051 ^b	0,094 ^a	0,099 ^a	0,129 ^a
НДВ	45,52	-	-	-	-
КДВ	33,19	31,23	30,79	30,49	31,86
КДНА	0,375	0,273 ^{ab}	0,229 ^b	0,254 ^b	0,255 ^b
КДНА, (%ОА)	10,75	7,92 ^{ab}	6,23 ^c	7,16 ^{bc}	7,19 ^{bc}

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=ферменты с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль;

²ТВ=бактерии, растущие на питательном агаре без сложных питательных потребностей; ЛАВ=бактерии, растущие на MRS, предположительно *Lactobacilli*; ОВ=органическое вещество; NH₃=аммиачный азот; ОА=общий азот; МК=молочная кислота; КДВ=кислотное детергентное волокно; КДНА=кислотный детергентный нерастворимый азот.

В табл. 1 показано влияние обработки консервантами для сена на химические и микробиологические профили образцов сена, собранных в день 0 (день прессования в тюки) и через 90 дней после прессования в тюки. Помимо молочной кислоты и кислотного детергентного нерастворимого азота (КДНА) различные виды обработки не оказали влияния ни на один из оцениваемых факторов, т.е. на рН, общий азот, аммиачный азот и КДВ. Концентрация молочной кислоты была ниже при обработке *P. anomala* по сравнению с другими видами обработки. По сравнению с другими видами обработки уровень КДНА (% СВ) был выше при обработке *P. anomala*. В образцах сена, полученных через 90 дней, обработка не оказала никакого влияния на популяции всех бактерий (бактерий, растущих на питательном агаре без сложных питательных потребностей), дрожжей и плесени. По сравнению с другими видами обработки популяции молочнокислых бактерий были более многочисленными в тюках, обработанных *P. anomala*, и в контроле, количество которых увеличилось с \log_{10} 3,80 КОЕ/г в день прессования до \log_{10} 5,42 и \log_{10} 6,29 КОЕ/г, соответственно, в день 90.

Таблица 2

Химический состав (% СВ), рН и микробиологический состав (КОЕ log₁₀) сена через 180 дней после обработки различными консервантами для сена при прессовании в тюки¹

Фактор ²	РА	СЕ	ВРА	CON
СВ	87,89 ^a	87,72 ^{ab}	85,64 ^b	85,79 ^b
рН	6,00 ^b	6,14 ^a	6,11 ^a	6,17 ^a
NA	6,14	7,25	7,23	7,23
MRS	5,21	6,32	6,28	6,74
Дрожжи	5,25 ^{ab}	5,82 ^a	4,67 ^b	4,27 ^b
Плесень	5,48	5,37	6,24	6,08
ОВ	88,59	87,93	87,80	87,63
NH ₃ , мг/кг	0,418	0,565	0,635	0,704
ОА	3,26	3,57	3,56	3,53
МК, (г/кг)	0,983	0,970	1,052	1,453
НДВ	44,18 ^b	44,78 ^b	46,33 ^b	50,07 ^a
КДВ	32,35 ^{bc}	32,76 ^b	33,72 ^b	34,55 ^a
КДНА	0,262	0,253	0,245	0,268
КДНА, (%ОА)	8,03	7,17	6,96	7,58

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=ферменты с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль;

²ТВ=бактерии, растущие на питательном агаре без сложных питательных потребностей; LAB=бактерии, растущие на MRS, предположительно *Lactobacilli*; ОВ=органическое вещество; NH₃=аммиачный азот; ОА=общий азот; МК=молочная кислота; КДВ=кислотное детергентное волокно; КДНА=кислотный детергентный нерастворимый азот.

В химическом и микробиологическом составе образцов, полученных через 180 дней, не наблюдалось никаких различий между видами обработки, кроме величины рН и популяции дрожжей (см. табл. 2). По сравнению со всеми другими видами обработки величина рН была самой низкой у *P. anomala* (6,00). Популяция дрожжей была самой многочисленной в случае обработки ферментами с хитиназной активностью.

Таблица 3

Концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК) в образцах сена, полученных с помощью бура, через 90 и 180 дней после обработки различными добавками при прессовании в тюки¹

ЛЖК	РА	СЕ	ВРА	CON
Ацетат (г/кг)				
90 д	8,95	8,55	10,53	6,97
180 д	9,69	9,58	8,38	7,28
Пропионат (г/кг)				
90 д	0,1333	0,1267	0,4667 ^a	0,1467
180 д	0,0675	0,080	0,426 ^a	0,052
Общее количество ЛЖК (г/кг)				
90 д	9,14	8,72	11,04	7,17
180 д	9,87	9,76	8,89	7,42

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=фермент с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль.

Из табл. 3 видно, что общая концентрация ЛЖК (летучих жирных кислот) и концентрация ацетата в образцах, полученных через 90 и 180 дней, не изменилась после обработки. Преобладающим среди ЛЖК, полученных через 180 дней хранения, был ацетат, доля которого составляла от 94 до 98% от общего количества ЛЖК, полученных в тюках. Через 180 дней хранения наблюдалась тенденция к увеличению количества ацетата и общего количества ЛЖК в тюках, обработанных *P. anomala* и ферментами с хити-

назной активностью. Концентрация ацетата и общая концентрация ЛЖК в тюках через 180 дней обработки *P. anomala* и ферментами с хитиназной активностью оказались по меньшей мере на 14% выше, чем в случае других видов обработки, что указывает на то, что обе эти обработки индуцировали в тюках более высокую степень анаэробного микробного брожения по сравнению с другими видами обработки. По сравнению с контрольной обработкой общая концентрация ЛЖК и концентрация ацетата в тюках через 180 дней обработки *P. Anomala* в комбинации с ферментами с хитиназной активностью были выше примерно на 32%. Как и ожидалось, концентрация пропионата в тюках, обработанных пропионовой кислотой, была соответственно выше через 90 и 180 дней в образцах других видов обработки (см. табл. 3).

Таблица 4

Оценка качества сена, обработанного различными добавками, после 180 дней хранения

Фактор качества	Тюк, №	РА	СЕ	ВРА	CON
ЦВЕТ	1	5	18	10	17
	2	17	18	5	5
	3	17	10	12	5
	4	5	–	10	10
	5	17	0	7	15
	Среднее	12,2	15,3	8,8	10,4
ЗАПАХ	1	2	12	12	12
	2	10	15	0	0
	3	7	5	12	0
	4	10	0	5	0
	5	17	0	5	12
	Среднее	11,2	10,7	6,8	4,8
ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ	1	7	30	22	29
	2	27	33	5	5
	3	34	15	24	5
	4	15	0	15	10
	5	34	0	12	27
	Среднее	23,5	26	15,6	15,2
ОЦЕНКА	1	P	G	P	A
	2	VP	G	VP	VP
	3	G	P	P	VP
	4	G	–	VP	VP
	5	G	–	P	P

РА=*Pichia anomala*; СЕ=ферменты с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль.

Цвет/запах определены на основе Информационного бюллетеня № 644, выпускаемого службой пропаганды знаний при университете штата Мэриленд (Maryland Cooperative Extension Fact Sheet), "Оценка качества сена" (<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

Цвет.

Сено ярко-зеленого цвета (15-20).

Сено от золотисто-желтого до желтого цвета - от 5 до 15 баллов.

Сено от коричневого до черного цвета - от 0 до 5 баллов.

Запах.

Запах свежескошенного сена имеет самый высокий балл (от 15 до 20 баллов).

Сено с затхлым или другим запахом получает от 5 до 15 баллов.

Сено с плесневелым или необычно пыльным запахом имеет очень низкие баллы (от 0 до 5 баллов).

Оценка.

Оценка основана на общей оценке эксперта, которая имела следующие градации: очень плохое (VP), плохое (P), среднее (A), хорошее (G), очень хорошее (VG) и отличное (E).

Все тюки вскрывали через 180 дней и их качество оценивали на основе Информационного бюллетеня № 644, выпускаемого службой пропаганды знаний при университете штата Мэриленд (Maryland

Cooperative Extension Fact Sheet). Исходя из визуальной и сенсорной оценки, сено наихудшего качества оказалось в контроле и в случае обработки пропионовой кислотой, сено, обработанное другими способами, было среднего и хорошего качества (табл. 4).

Термостойкость.

Термостойкость тюков контролировали путем постоянного измерения температуры внутри каждого тюка с помощью трех контактных кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), которые были вставлены в отверстия, сделанные с помощью бура, на следующее утро после прессования. Контактные кнопки были выполнены с возможностью записи температуры каждый час в течение первых 60 дней срока хранения. Поскольку результаты измерения температуры не выявили дальнейшего нагревания, зонды не были помещены обратно в тюки через 60 дней. Тюки вскрывали и проводили визуальную оценку порчи и наличия плесени в конце периода хранения (180 дней) на основе Информационного бюллетеня № 644, выпускаемого службой пропаганды знаний при университете штата Мэриленд (Maryland Cooperative Extension Fact Sheet)

(<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

Как показано на фиг. 1, средняя недельная температура окружающей среды (зона хранения тюков) понижалась с максимальной, равной примерно 16°C в течение первой недели хранения, до минусовых температур после недели 7. Тем не менее, в течение первых трех недель периода хранения температура во всех кипах оставалась выше 20°C. Самая высокая недельная температура (примерно 34°C) была зарегистрирована на второй неделе в контрольных тюках. Средняя температура в контрольных тюках в течение первых трех недель составляла примерно 30°C. Температура в тюках, обработанных ферментами с хитиназной активностью, последовательно понижалась по сравнению с контрольными тюками с 1 по 7 неделю (фиг. 1). Аналогичная тенденция (за исключением второй недели) наблюдалась при сравнении с обработкой пропионовой кислотой (фиг. 2). Хотя все виды обработки оказали положительное влияние на понижение температуры в тюках во время хранения, наиболее эффективной обработкой по сравнению с контролем и обработкой пропионовой кислотой оказалась обработка ферментами с хитиназной активностью. По сравнению с контрольными тюками и тюками, обработанными пропионовой кислотой, средняя температура в тюках, обработанных ферментами с хитиназной активностью, была на 6-8°C и 4-5°C ниже температуры в контрольных тюках и тюках, обработанных пропионовой кислотой, в течение одного и того же периода времени.

Эксперимент с участием животных.

Скорость *in situ* и степень исчезновения СВ и НДВ в образцах сена через 180 дней определяли с участием трех коров с установленной на рубец канюлей, которых перед этим кормили стандартным для загона кормом, состоящим из 50% тимофеевки и 50% ячменного силоса (основа СВ). Дополнительные образцы, взятые из образцов сена через 180 дней, полученных из тюков, обработанных тем же самым консервантом, собирали и измельчали, пропуская через 4 мм сито. Примерно 4 г каждого композитного образца взвешивали в мешках Дагтон и инкубировали в трех повторах в каждой корове в течение 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Мешки были изготовлены из моноволоконной полиэфирной сетки (размер пор 53 мкм, 5 см × 20 см, Ankom, Fairport, New York). В течение двух недель до начала инкубации коровы получали этот корм для адаптации к этому корму. Сразу после инкубации мешки промывали холодной водопроводной водой до полного удаления содержимого рубца с внешней стороны мешков. Мешки стирали в бытовой стиральной машине в холодной воде в течение 3 мин, используя цикл деликатной стирки без моющего средства и отжима. Процедуру стирки выполняли один раз. Дублированные наборы неинкубированных сумок, содержащих образцы каждой обработки, промывали с указанными выше мешками и использовали для оценки 0 ч исчезновения для каждой обработки. Затем все мешки сушили в печи с воздушной конвекцией при 55°C в течение 48 ч. Перед проведением анализа на содержание НДВ согласно описанным выше методам, остатки из трех мешков с одинаковой обработкой, инкубированных в одной корове, объединяли и измельчали, пропуская через 1 мм сито. Выраженное в процентах исчезновение СВ и НДВ рассчитывали исходя из содержимого, оставшегося в мешках после каждого времени инкубации. Данные об исчезновении СВ и НДВ адаптировали к модифицированной версии экспоненциальной модели Орскова и Макдональда (Orskov and McDonald (1979)) с лаг-фазой

$$p = a + b(1 - e^{-c(t - \text{lag})}) \text{ для } t > \text{lag}$$

где p - исчезновение СВ или НДВ (%) через t ч, a - быстро исчезающая фракция (%), b - медленно исчезающая фракция (%), c - скорость исчезновения (ч^{-1}) фракции b .

Параметры оценивали с помощью итеративной нелинейной процедуры (метод Маркардта (Marquardt)), используя пакет программного обеспечения SAS (1990). Эффективное исчезновение (EFFD, %) через 48 ч инкубации оценивали исходя из предполагаемой 6% доли выхода фракции.

Влияние консерванта для сена¹ на исчезновение in situ СВ (%)² сена, состоящего из люцерны и костра, инкубированного в рубце коров Джерси (Jersey)

Исчезновение е ³	РА	СЕ	ВРА	CON
12ч	66, 65 ^a	62, 92 ^c	62, 20 ^c	61, 38 ^c
24ч	75, 13 ^a	72, 65 ^b	72, 84 ^b	70, 86 ^c
48ч	78, 37 ^a	77, 22 ^a	78, 57 ^a	75, 62 ^b
Кинетически е показатели				
a	34, 13	34, 65	33, 34	34, 37
b	44, 62 ^{ab}	43, 21 ^b	46, 38 ^a	42, 11 ^b
c, ч ⁻¹	0, 114 ^a	0, 089 ^{bc}	0, 083 ^c	0, 087 ^c
Потенциальн ое	78, 75 ^a	77, 86 ^{ab}	79, 72 ^a	76, 48 ^b
Эффективное	62, 92 ^a	60, 40 ^b	59, 97 ^b	59, 09 ^b

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=ферменты с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль;

²средние значения в одной строке с разными надстрочными индексами отличаются (P<0,05);

³параметры, рассчитанные по уравнению: $p=a+b [1-e^{-c(t-lag)}]$ для $t > lag$; где p - доля (%) НДВ, исчезающее из нейлоновых мешков через t ч инкубации; a - быстро исчезающая фракция (%); b - медленно исчезающая фракция (%); c - скорость исчезновения (ч⁻¹) фракции b.

Исчезновение сухого вещества в сумке.

Влияние консервантов на исчезновение СВ через 12, 24 и 48 ч, включая кинетику исчезновения, приведено в табл. 5. Исчезновение СВ происходило без лаг-периода. Образцы сена, обработанные микробной добавкой (*P. anomala*), имели более высокую скорость исчезновения СВ во всех временных точках инкубации (12, 24 и 48 ч) по сравнению с контролем и обработкой пропионовой кислотой; за исключением 48 ч, когда все добавки (включая ферменты с хитиназной активностью и пропионовую кислоту) были выше, чем в контроле. Аналогично, и скорость, и эффективность исчезновения СВ были выше в образцах сена, обработанных микробными добавками, по сравнению с контролем и обработкой пропионовой кислотой. По сравнению со всеми другими видами обработки образцы сена из тюков, обработанных *P. anomala*, имели самую высокую скорость исчезновения СВ (0,114 ч⁻¹). Самая низкая скорость 0,083 ч⁻¹ и 0,087 ч⁻¹ наблюдалась в случае обработки пропионовой кислотой и в контроле. Все добавки увеличивали потенциально перевариваемую фракцию СВ, за исключением ферментов с хитиназной активностью, в которой она была аналогичной фракции в контроле. Тем не менее эффективное исчезновение СВ в образце, обработанном *P. anomala*, было выше, чем в контроле и при обработке пропионовой кислотой.

Таблица 6

Влияние консервантов¹ для сена на исчезновение in situ НДВ (%)² сена, состоящего из люцерны и костра, инкубированного в рубце коров Джерси (Jersey)

Исчезновение е ³	РА	СЕ	ВРА	CON
12ч	41,06 ^b	37,28 ^c	39,04 ^{bc}	39,64 ^{bc}
24ч	51,88 ^{ab}	49,22 ^b	51,88 ^{ab}	51,11 ^b
48ч	58,23 ^b	56,07 ^c	60,19 ^{ab}	58,38 ^{ab}
Кинетически е показатели				
а	19,28	19,90	19,11	18,80
б	40,48	37,67	43,59	41,54
с, ч ⁻¹	0,078	0,076	0,069	0,070
лаг период	1,89 ^b	3,67 ^a	2,87 ^{ab}	1,91 ^b
Потенциальн ый	59,76 ^{bc}	57,57 ^c	62,70 ^a	60,34 ^b
Эффективный	39,87 ^b	36,66 ^b	38,84 ^b	38,94 ^b

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=ферменты с хитиназной активностью; ВРА=пропионовая кислота; CON=контроль;

²средние значения в одной строке с разными надстрочными индексами отличаются (P<0,05);

³параметры, рассчитанные по уравнению: $p = a + b[1 - e^{-c(t-lag)}]$ для $t > lag$; где p - доля (%) НДВ, исчезающее из нейлоновых мешков через t ч инкубации; a - быстро исчезающая фракция (%); b - медленно исчезающая фракция (%); c - скорость исчезновения (ч⁻¹) фракции b.

Несмотря на отсутствие различий между обработками с точки зрения скорости исчезновения НДВ, быстро исчезающей фракции и медленно исчезающей фракции, самым эффективным было исчезновение в сене, обработанном *P. anomala*, по сравнению со всеми другими видами обработки (табл. 6). Самый длительный лаг-период в исчезновении НДВ наблюдали в сене, обработанном ферментами с хитиназной активностью (3,67 ч), а самый короткий лаг-период 1,89 ч наблюдали в случае обработки *P. anomala*. Однако последний лаг-период не отличался от лаг-периода для других видов обработки. Общий показатель исчезновения НДВ через 12, 24 и 48 ч находился в пределах от 37,28% (самое низкое значение) в сене, обработанном ферментами с хитиназной активностью, до 41,06% (самое высокое значение) в сене, обработанном *P. anomala*, при этом сено, обработанное другими методами, имело промежуточные значения. Аналогичная тенденция наблюдалась и для 24 ч исчезновения. Исчезновение НДВ через 48 ч было самым низким в случае обработки ферментами с хитиназной активностью по сравнению со всеми другими видами обработки.

Данные по исчезновению СВ из мешков свидетельствуют о том, что *P. anomala* увеличивает потенциально перевариваемую фракцию, а также скорость и эффективность исчезновения этой фракции сена по сравнению с контролем. Фактически, значения эффективного исчезновения в сене, обработанном *P. anomala*, были выше, чем в контроле и при обработке пропионовой кислотой.

Пример 2. Сено, условия обработки и прессования в тюки.

Сено представляло собой сено люцерны и было собрано 15 августа 2012 г. в Форт-Маклеод, Альберта, Канада. Сено люцерны сушили в поле до уровня влажности от примерно 24% до примерно 30%. Влажность тюка определяли согласно тому, как описано в примере 1.

Количество наносимой комбинации *P. anomala* с ферментом с хитиназной активностью составляло соответственно 10¹¹ КОЕ и 1,5 г на 1 л воды на 1 т сена. Соответственно, количество, наносимой комбинации *P. repositus* в комбинации с ферментом, имеющим хитиназную активность, составляло 10¹¹ КОЕ и 1,5 г на 1 л воды на 1 т сена. Продукт пропионовой кислоты, состоящий из 68% (об./об.) пропионовой кислоты, наносили с концентрацией 2,72 л/т и рассматривали в качестве положительного контроля. Отрицательным контролем была вода, которую наносили с концентрацией 1 л на 1 т сена. Для каждого вида обработки в тот же день изготавливали пять крупных круглых тюков весом примерно 800 кг в соответствии с примером 1. Образцы, полученные из тюков с помощью бура, собирали для каждого вида обработки в дни 0, 90 и 180 после прессования в тюки для оценки их пищевой ценности, продукта ферментации и микробных изменений.

Полученные с помощью бура образцы, собранные в дни 0 и 90, 180 после прессования в тюки, были подвергнуты микробиологическому и химическому анализу. Микробиологический анализ проводили с целью определения количества, выделения и характеристики микроорганизмов (общего количества бактерий, дрожжей и плесени) на соответствующих планшетах методом серийного разведения.

Таблица 7

Количество микробов в сене люцерны, обработанной различными консервантами для сена при прессовании в тюки

Обработка	Дни	Контроль	Pichia+ф ерменты	Pedio+фе рменты	Пропионовая кислота
Общее количество бактерий, log КОЕ/г DM	0	5,92	5,28	6,22	6,34
	90	7,79 ^{ab}	7,34 ^{bc}	6,69 ^c	8,49 ^a
	180	8,27 ^a	6,25 ^b	6,08 ^b	8,25 ^a
ДРОЖЖИ	0	4,94	4,98	5,86	5,49
	90	6,57	4,70	5,05	6,22
	180	5,13	4,69	4,40	4,89
ПЛЕСЕНЬ	0	4,83	4,79	4,99	4,66
	90	5,89	5,81	5,85	5,91
	180	6,49 ^a	6,92 ^a	6,69 ^a	5,36 ^b

Во время прессования в тюки микробиологический профиль сена после каждой обработки оставался аналогичным в отношении общего количества бактерий, дрожжей и плесени, даже в случае регистрации количественных различий. Через 90 дней после прессования тюков общее количество бактерий при обработке ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pediosoccus pentosaceus* уменьшилось по сравнению с контролем и обработкой пропионовой кислотой, тогда как обработка ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* привела к уменьшению количества бактерий. Было отмечено восстановление численности дрожжей в двух видах обработки ферментами с хитиназной активностью как в комбинации с *Pichia anomala*, так и в комбинации с *Pediosoccus pentosaceus*, в отличие от контроля и обработки пропионовой кислотой. Обработка образцов не оказала никакого влияния на количество плесени, кроме образцов, полученных через 180 дней, в которых количество плесени уменьшилось в случае обработки пропионовой кислотой.

Проводили химические анализы для определения величины рН, ЧВ, общего азота, аммиачного азота, НДВ, КДВ, кислотного детергентного нерастворимого азота (КДНА), водорастворимых углеводов, летучих жирных кислот (ЛЖК) и молочной кислоты (МК).

Таблица 8

Химический состав сена люцерны в дни 0, 90 и 180 после обработки консервантом для сена при прессовании в тюки

Обработка	Дни	Контроль	Pichia+ф ерменты	Pedio+фе рменты	Пропионовая кислота
СВ%	0	68,9 ^{ad}	76,5 ^{bc}	80,4 ^a	66,9 ^d
	90	82,6 ^b	85,6 ^a	87,3 ^a	79,8 ^c
	180	83,7 ^{bc}	87,9 ^a	88,5 ^a	80,1 ^c
НДВ%	0	39,3	39,6	38,6	40,1
	90	55,5 ^a	47,7 ^{cd}	45,2 ^d	53,0 ^{ab}
	180	51,3	54,8	55,3	54,6
КДВ%	0	28,3	29,4	28,9	28,7
	90	39,1 ^a	31,6 ^{cd}	30,5 ^d	37,1 ^{ab}
	180	33,7 ^c	637,6 ^{ab}	35,4 ^{bc}	38,2 ^a
ОА%	0	3,7	3,7	3,5	3,9
	90	3,7	3,7	3,8	4,1
	180	3,8 ^b	3,8 ^b	3,8 ^b	4,2
КДНА% N	0	7,2 ^a	5,0 ^b	5,1 ^b	7,3 ^a
	90	17,8 ^a	10,6 ^b	8,7 ^b	18,8 ^a
	180	12,3 ^b	16,9 ^{ab}	15,4 ^b	20,1 ^a

Ферменты с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus* с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus*, ферменты с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus*.

Продукт ферментации сена люцерны, обработанной различными консервантами для сена при прессовании в тюки

Обработка	Дни	Контроль	<i>Pichia</i> +ф ерменты	<i>Pedio</i> +фе рменты	Пропионовая кислота
рН	0	6,16 ^b	6,23 ^a	6,23 ^a	6,07 ^c
	90	7,64 ^a	5,92 ^b	5,87 ^b	8,29 ^a
	180	7,40 ^{ab}	6,15 ^c	6,03 ^c	7,80 ^a
МК г/кг СВ	90	0,32	0,26	0,17	0,49
	180	0,26	0,11	0,10	0,17
янтарная кислота	90	0,26	0,25	0,24	0,20
	180	0,23	0,23	0,24	0,28
уксусная кислота	90	0,04	0,31	0,29	0,42
	180	0,29	0,29	0,63	0,71
пропионовая кислота	90	NA	NA	NA	0,08
	180	NA	NA	NA	0,04
Общее количество ЛЖК	90	0,04	0,31	0,33	0,50
	180	0,29	0,29	0,66	0,76

На процесс ферментации сена не оказала сильного влияния обработка ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediococcus pentosaceus*, так как этот кормовой материал не подвержен ферментации. Однако более низкий рН наблюдается через 90 дней в случае обработки ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediococcus pentosaceus*.

Полученные с помощью бура образцы сена собирали в день 180 и оценивали его питательную ценность методами *in situ* и *in vitro*.

Проводили эксперименты *in situ* для оценки влияния консервантов для сена на скорость и степень переваривания образцов сена, собранных через 180 дней после прессования тюков. Для этого использовали трех коров с установленной на рубец канюлей, которых перед этим кормили стандартным для загона кормом. Примерно 4 г каждого композитного образца из каждого тюка (с повтором) на каждую обработку взвешивали в мешках Дасгон и инкубировали в трех повторях в каждой корове в течение 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Мешки извлекали после инкубации и обрабатывали в соответствии с LRC SOP для определения *in situ* исчезновения СВ и НДВ.

Таблица 11

Параметры *in situ* для сена люцерны, обработанной консервантами для сена при прессовании тюков

Обработка	Контроль	<i>Pichia</i> +ферм енты	<i>Pedio</i> +ферме нты	Пропионовая кислота
a	26,61 ^{bc}	30,05 ^{ab}	33,79 ^a	23,64 ^c
b	46,80 ^{ab}	43,08 ^{bc}	39,67 ^c	51,69 ^a
c	0,05 ^c	0,06 ^{bc}	0,07 ^{ab}	0,04 ^c
лаг период	1,80 ^{bc}	3,90 ^{abc}	4,30 ^{abc}	1,70 ^c
a+b	73,4	73,1	73,5	75,3

a=быстро перевариваемая фракция,

b=медленно перевариваемая фракция,

c=скорость переваривания и (мл/ч),

lag=лаг-период (ч).

Данные *in situ*, приведенные в табл. 11, показывают, что сено, обработанное ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediococcus pentosaceus*.

Также проводили эксперимент *in vitro* для оценки влияния микробных инокулянтов на образование газа и кинетические характеристики образцов сена через 180 дней. Выполняли два теста смешанной жидкости из рубца трех коров с установленной на рубец канюлей, которых перед этим кормили стандартным для загона кормом. Для каждой обработки во флаконах взвешивали примерно 0,5 г каждого композитного образца сена, полученного через 180 дней хранения, и инкубировали в трех повторях для каждого теста, а газ измеряли через 3, 6, 9, 12, 24 и 48 ч. Флаконы извлекали после инкубации и обрабатывали в соответствии с LRC SOP для определения *in vitro* исчезновения СВ, образования газа, аммиака и ЛЖК.

In vitro перевариваемость сена люцерны, обработанного консервантами для сена при прессовании в тюки

Обработка	Контроль	Pichia+ферменты	Pedio+ферменты	Пропионовая кислота
DMD г/кг	426 ^d	470 ^b	488 ^b	431 ^d
a	174 ^c	188 ^{bc}	196 ^{ab}	177 ^c
c	6,4 ^c	7,7 ^{bc}	8,4 ^b	6,6 ^c
лаг период	0,54 ^a	0,08 ^b	0,06 ^b	0,48 ^a

a=асимптотическое образование газа (мл/г СВ),

c=скорость ферментации фракции, скорость образования количества газа (мл/ч),

lag=лаг-период (ч).

In vitro переваримость и ферментируемость сена через 180 дней подтвердили in situ результаты повышенной усвояемости для обоих видов обработки сена ферментами с хитиназной активностью в комбинации как с *Pichia anomala*, так и *Pediosoccus pentosaceus*.

Термостойкость.

Температуру каждого тюка контролировали путем непрерывного измерения внутренней температуры в течение всего периода хранения с помощью трех (3) контактных кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), введенных во внутреннюю часть каждого тюка сразу же после сбора урожая (показано на чертежах). Температуру регистрировали с интервалом 4 ч в течение 10 недель.

Как показано на фиг. 2, обработка ферментами с хитиназной активностью в комбинации как с *Pichia anomala*, так и с *Pediosoccus pentosaceus* имела пониженную среднюю температуру в течение 60 дней после прессования в тюки. При обработке пропионовой кислотой средняя температура во всех временных точках была самой высокой.

Значительность этого эффекта хорошо видна на фиг. 3. На фиг. 3 показано насколько долго температура была выше 40°C при каждом виде обработки. Поскольку эта температура общепризнана в качестве пороговой для повреждений, показателем которых является уровень КДНА, она показывает интенсивность внутренней температуры тюков сена. Для обработки пропионовой кислотой период, при котором температура оставалась выше 40°C, оказался самым продолжительным. В случае обработки ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pediosoccus pentosaceus* время нахождения при температуре выше 40°C было самым коротким, за которым следовало время для обработки ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala*, причем для обоих видов обработки, проводимых ферментами с хитиназной активностью в комбинации с *Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus*, время нахождения при температуре выше 40°C было короче, чем в контроле.

В заключение следует отметить, что комбинация ферментов с хитиназной активностью с *Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus* снижала внутреннюю температуру тюков сена, величину pH и общее количество бактерий по сравнению с контролем и обработкой пропионовой кислотой во время хранения. Эти виды обработки также привели к увеличению in situ исчезновения сухого вещества (DMD) и скорости расщепления, а также in vitro DMD и скорости газообразования. Это можно объяснить пониженным содержанием НДВ и КДВ в случае этих двух обработок.

Пример 3.

Этот пример показывает, что консервирующее действие фермента с хитиназной активностью и его способность предотвращать и/или уменьшать порчу сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия еще более усиливается, если по меньшей мере один фермент с хитиназной активностью объединен с дрожжами рода *Pichia* или бактериями рода *Pediosoccus*. Сено было собирали и сушили в поле до уровня влажности, как описано в примере 2.

Количество наносимой комбинации *P. anomala* с ферментом с хитиназной активностью составляло соответственно 10¹¹ КОЕ и 1,5 г на 1 л воды на 1 т сена. Соответственно, количество наносимой комбинации *P. pentosaceus* в комбинации с ферментом с хитиназной активностью составляло 10¹¹ КОЕ и 1,5 г на 1 л воды на 1 т сена. Количество наносимого только *P. Anomala* было равно 10¹¹ КОЕ в 1 л на 1 т сена. Количество наносимого только *P. anomala* было равно 10¹¹ КОЕ в 1 л на 1 т сена. Фермент с хитиназной активностью наносили в количестве 1,5 г (суспендированной в 1 л воды) на 1 т сена. Продукт пропионовой кислоты, состоящий из 68% (об./об.) пропионовой кислоты, наносили с концентрацией 2,72 л/т и рассматривали в качестве положительного контроля. Отрицательным контролем была вода, которую наносили с концентрацией 1 л на 1 т сена. Для каждого вида обработки в тот же день изготавливали пять крупных круглых тюков весом примерно 800 кг в соответствии с примером 1.

Как и в примере 2, температуру каждого тюка контролировали путем непрерывного измерения внутренней температуры в течение всего периода хранения с помощью трех (3) контактных кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), введенных во внутреннюю часть каждого

тюка сразу после сбора урожая (показано на чертежах). Температуру регистрировали с интервалом 4 ч в течение 10 недель. Как показано на фиг. 4, когда по меньшей мере один фермент с хитиназной активностью объединяют с *P. anomala* или *P. pentosaceus*, то в результате такого комбинирования снижение температуры сена с высоким содержанием влаги неожиданно значительно увеличивается по сравнению с использованием каждого компонента по отдельности.

Пример 4. Задача испытания.

Это испытание расширяет набор доказательств в пользу концепции добавки для сена, которая уменьшила бы нагрев тюков, изготовленных в сложных условиях уборки (содержание влаги, выше оптимального уровня). Оно соответствовало аналогичному испытанию, проводимому в масштабе лаборатории. Анализировали профиль температуры небольших квадратных тюков (~25 кг, 79,9% СВ), инокулированных с использованием различных комбинаций двух микроорганизмов (*Pichia anomala* или *Pediosoccus pentosaceus*) с двумя ферментами (чистая хитиназа или коммерческий фермент, имеющий пектиналиазную, глюканиазную и хитиназную активности).

Метод исследования.

Испытание проводили, используя небольшие квадратные тюки смеси люцерны с травой (45:55) со средним весом на момент сбора урожая 25,0 кг. Средний уровень влажности тюков составлял 79,9% СВ, в пределах ожидаемого уровня сухого вещества (80-83% СВ). Тюки обрабатывали разными инокулянтами с помощью аппарата Дорманна для внесения бактериального раствора после опрыскивания фуража перед камерой резки тюка. Согласно плану эксперимента наносили контрольную и четыре различные дополнительные смеси микробных добавок (без добавок, *Pichia anomala*+хитиназа, *Pichia anomala*+смесь ферментов, *Pediosoccus pentosaceus*+хитиназа, *Pediosoccus pentosaceus*+смесь ферментов).

В каждом виде обработки распыление выполняли, используя шесть квадратных тюков, разбитых на три группы по два тюка. Тюки перевозились в хранилище, взвешивали и помещали на поддоны по заранее определенной полностью рандомизированной схеме таким образом, чтобы тюки не контактировали друг с другом. Каждый тюк оснащали температурным зондом, который помещали в геометрический центр тюка. Тюки хранили в течение 100 дней.

Результаты.

Говоря в общем, те виды обработки, которые включали *Pichia anomala* (№ 2 и 3 в табл. 13), показали более медленный нагрев тюков, но смесь *Pichia anomala* с хитиназой (№ 3) значительно замедляла нагревание и время, в течение которого температура тюков на 5°C и на 10°C превышала температуру окружающей среды (табл. 13). Эта обработка также показала более низкую температуру между 400 и 600 ч инкубации. Добавление смеси ферментов со штаммом *Pichia anomala* приводила к некоторому количественному улучшению, хотя улучшение было более низким, чем в случае использования смеси с хитиназой.

До начала нагревания тюков, обработанных смесями *Pediosoccus pentosaceus* (№ 4 и 5), проходило большее количество времени. Использование ферментов обоих типов давало сопоставимые преимущества по уменьшению времени, проведенному при температуре на 10°C выше по сравнению с температурой окружающей среды (табл. 13).

Таблица 13

Описание обработки и данные профиля температуры в зависимости от времени

Номер обработки и	Микробная добавка	Ферментная добавка	Время пребывания при температуре на 5°C выше окружающей (ч)	Время пребывания при температуре на 10°C выше окружающей (ч)
1	Нет	Нет	390,6	290,6 a
2	<i>Pichia anomala</i>	Смесь ферментов	295,2	193,9 ab
3	<i>Pichia anomala</i>	Хитиназа	230,0	120,4 b
4	<i>Pediosoccus pentosaceus</i>	Смесь ферментов	320,4	196,3 ab
5	<i>Pediosoccus pentosaceus</i>	Хитиназа	329,6	224,4 ab
			P=0,0971 SEM=58,24	P=0,0394 SEM=50,43

Хотя изобретение было описано на примере конкретных вариантов осуществления, должно быть понятно, что оно может быть модифицировано, и это описание охватывает любые изменения, применения или адаптации изобретения, в общем, согласно принципам изобретения и включают такие отклоне-

ния от настоящего раскрытия, которые входят в известную или обычную практику в области, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше, и находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Консервант для сена, содержащий по меньшей мере один фермент с хитиназной активностью в комбинации с дрожжами рода *Pichia* или бактериями рода *Pediosoccus* в количестве, эффективном для предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия.

2. Консервант для сена по п.1, в котором по меньшей мере один фермент с хитиназной активностью имеет хитиназную активность в интервале от примерно 6 до 300 U на 1 т сена, подлежащего консервации.

3. Консервант для сена по п.1 или 2, в котором дрожжи рода *Pichia* представляют собой *Pichia anomala* sp.

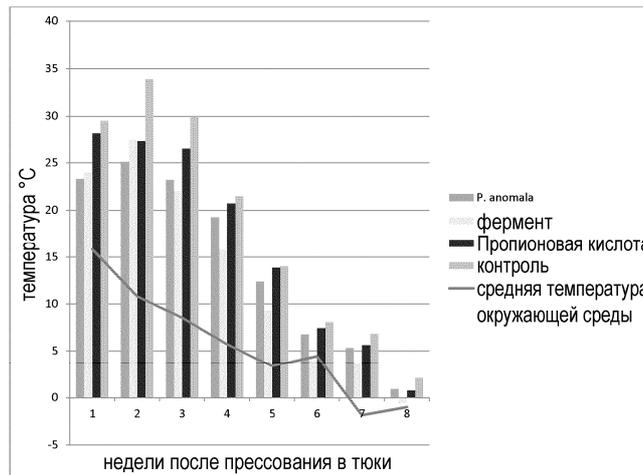
4. Консервант для сена по любому из пп.1-3, в котором дрожжи рода *Pichia* представляют собой штамм *Pichia anomal* DBVPG 3003.

5. Консервант для сена по п.1 или 2, в котором бактерии рода *Pediosoccus* представляют собой *Pediosoccus pentosaceus* sp.

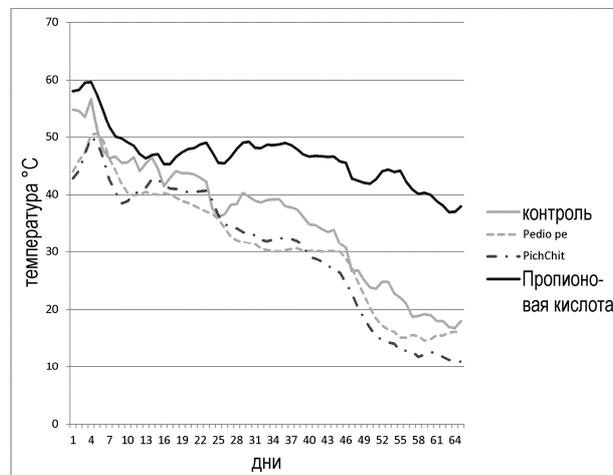
6. Консервант для сена по пп.1, 2 или 5, в котором бактерии рода *Pediosoccus* представляют собой штамм *Pediosoccus pentosaceus* BTC328 NCIMB 12674 или штамм BTC401 NCIMB 12675.

7. Консервант для сена по любому из пп.1-6, дополнительно содержащий по меньшей мере один фермент с пектин-лиазной активностью, глюконазой активностью или их смесь.

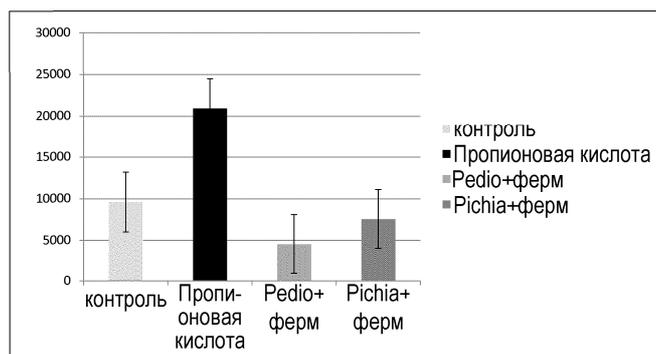
8. Способ предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, включающий добавление в сено консерванта по любому из пп.1-7.



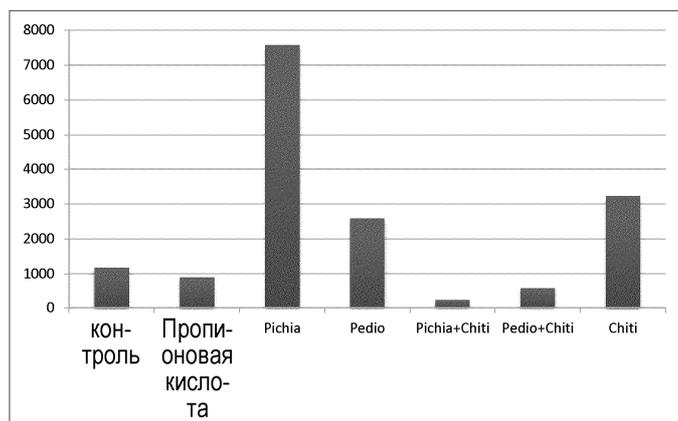
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

