



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.12

(21) Номер заявки
201791141

(22) Дата подачи заявки
2015.11.24

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

(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 Fermentasyon, 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

Проявление 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 *Pediococcus*.

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 бактерий рода *Pediococcus*.

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 *Pediococcus*. 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 *Pediococcus* (*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 *Pediococcus* (*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 *Pediococcus* (*Pedio*+ферм.), и тюков сена люцерны, обработанных только дрожжами рода *Pichia* (*Pichia*), бактериями рода *Pediococcus* (*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 kg).

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 хомутками. 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 AOAC (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, %), pH 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 |
| pH | 6,25 | 6,11 | 6,24 | 6,00 | 6,36 |
| ТВ | – | 7,14 | 6,60 | 6,10 | 7,51 |
| LAB | 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; 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 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 pH, 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), pH 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 |
| pH | 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 составах образцов, полученных через 180 дней, не наблюдалось никаких различий между видами обработки, кроме величины pH и популяции дрожжей (см. табл. 2). По сравнению со всеми другими видами обработки величина pH 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. ananala* 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. Ananala* 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 ananala*; 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 свежежескошенного 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 Dacron 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

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

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.

Таблица 5

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

| Исчезновение 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 |
| Кинетические 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 |
| Потенциальное | 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 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} |
| Кинетические показатели | | | | |
| a | 19,28 | 19,90 | 19,11 | 18,80 |
| b | 40,48 | 37,67 | 43,59 | 41,54 |
| c, ч ⁻¹ | 0,078 | 0,076 | 0,069 | 0,070 |
| лаг период | 1,89 ^b | 3,67 ^a | 2,87 ^{ab} | 1,91 ^b |
| Потенциальный | 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. renesseensis* 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 pH, 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*.

Таблица 9

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 Dacron 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.

Таблица 12

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

| Обработка | Контроль | <i>Pichia</i> +ферменты | <i>Pedio</i> +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 значимо 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 пектиназную, глюканазную 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.

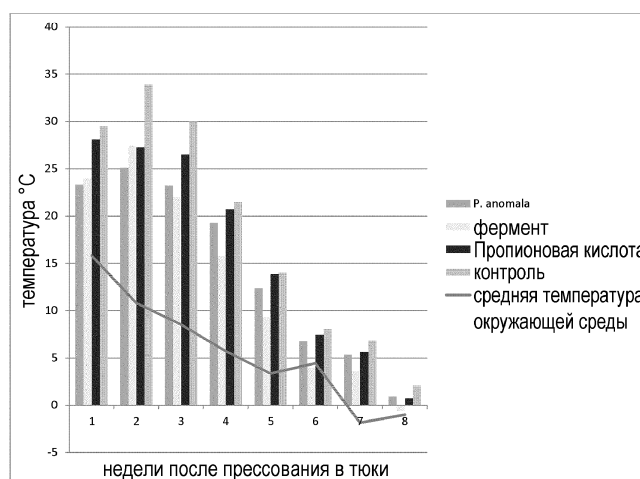
4. Консервант для сена по любому из пп.1-3, в котором дрожжи рода *Pichia* представляют собой штамм *Pichia anomal* DBVPG 3003.

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

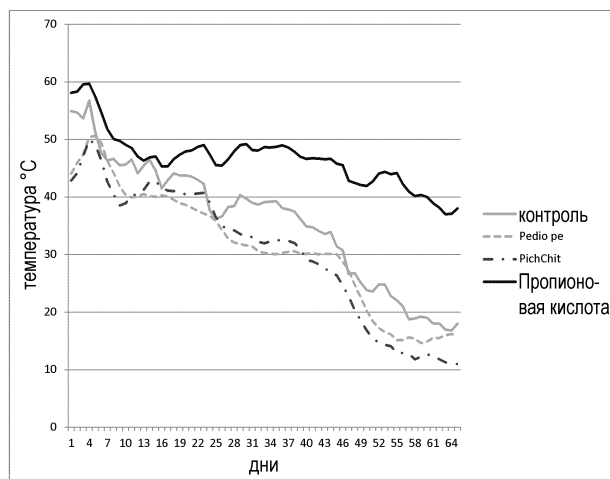
6. Консервант для сена по пп.1, 2 или 5, в котором бактерии рода *Pediosoccus* представляют собой штамм *Pediosoccus pentosaceus* BTC328 NCIMB 12674 или штамм BTC401 NCIMB 12675.

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

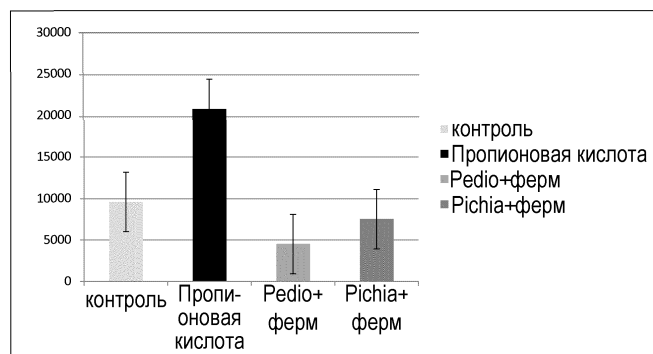
8. Способ предотвращения и/или уменьшения порчи сена с высоким содержанием влаги в результате теплового воздействия, включающий добавление в сено консерванта по любому из пп.1-7.



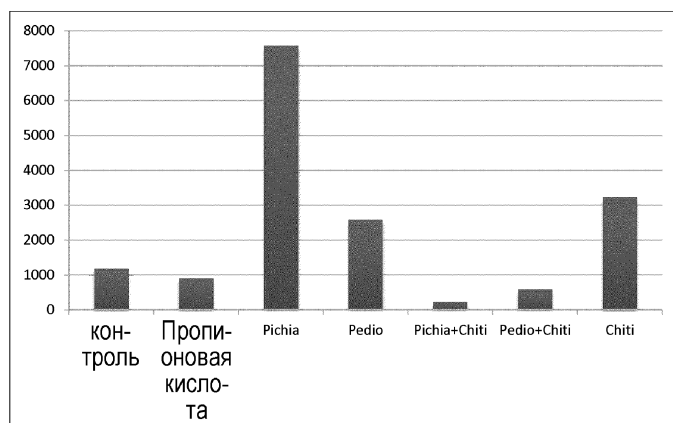
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

