República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0514826-0 B1

(22) Data do Depósito: 01/09/2005

(45) Data de Concessão: 03/11/2020

(54) Título: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE MATERIAIS VEGETAIS PRÉ-ENSILADOS, MÉTODO PARA INTENSIFICAR A DIGESTÃO DE FIBRAS VEGETAIS EM UM ANIMAL E COMPOSIÇÃO PARA O USO COMO UM INÓCULO DE SILAGEM

(51) Int.Cl.: A23K 1/165; C12R 1/225; C12N 9/18.

(30) Prioridade Unionista: 01/09/2004 US 60/606,389.

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC..

(72) Inventor(es): VICTOR NSEREKO; WILLIAM RUTHERFORD; BRENDA K. SMILEY; ANNETTE SPIELBAUER.

(86) Pedido PCT: PCT US2005031489 de 01/09/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/026763 de 09/03/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/03/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES PAPA O USO COMO INÓCULOS DE SILAGEM, MÉTODOS DE TRATAMENTO DE MATERIAIS VEGETAIS PRÉ-ENSILADOS E LINHAGEM BACTERIANA SUBSTANCIALMENTE PURIFICADA. São descritas, na invenção, linhagens bacterianas produtoras de ferulato esterase ou linhagens mutantes funcionais destas. A invenção provê, ainda, métodos para uso das mesmas como aditivo de forragem.

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE MATERIAIS VEGETAIS PRÉ-ENSILADOS, MÉTODO PARA INTENSIFICAR A DIGESTÃO DE FIBRAS VEGETAIS EM UM ANIMAL E COMPOSIÇÃO PARA O USO COMO UM INÓCULO DE SILAGEM

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] São descritos organismos que produzem ferulato esterase e métodos de uso dos mesmos para intensificar digestão de fibra vegetal em animais, assim como, intensificar a preservação de forragem ensilada.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] A parede celular vegetal é uma complexa estrutura consistindo de diferentes polissacarídeos, sendo os principais componentes celulose, hemiceluloses e pectinas. Esses polissacarídeos podem ser ligados cruzadamente, ou ligados a lignina por grupos de ácidos fenólicos, tais como ácido ferúlico. Ácido ferúlico pode desempenhar um papel no controle de crescimento de parede celular na planta e acredita-se que a ligação cruzada de ácido ferúlico na parede celular restrinja a digestão de parede celular por microorganismos (Fry *et al.*, (1983) *Planta* 157: 111-123; e Borneman *et al.*, (1990) *Appl. Microbial. Biotechnol.* 33: 345-351). A resistência da parede celular vegetal à digestão apresenta desafios significantes na indústria de produção animal. Alguns microorganismos são conhecidos por exibir atividade de ácido ferúlico esterase (ferulato esterase) e, dessa forma, facilitar a quebra de paredes celulares vegetais e digestão de fibras (US 6.143.543).

[0003] No presente, na agricultura de criação, enquanto uma dieta de alta grau de forragem é desejável, isso não satisfaz a demanda da produção animal moderna. A digestão de fibras é um fator limitante a produção e composição de leite do rebanho leiteiro, a para a produção de carne em operações de alimentação com dieta de alto grau de forragem de rebanhos de corte e, assim, restringe a lucratividade de fazendeiros. Intensificar a digestão de fibras possui um impacto duplo: 1) o animal come mais devido a um reduzido preenchimento do trato digestivo e, portanto, produz mais, e 2) o animal obtém mais daquilo que come, já que a fibra é mais digerível. Finalmente, essas mudanças deveriam aumentar a produção de leite, em vacas leiteiras, e produção de carne em animais alimentados com forragem. Fazendeiros devem agüentar um nível menor de digestibilidade de alimentação e, assim, produtividade, ou podem usar inóculos, aditivos de forragem ou outros aperfeiçoamentos que melhorem a digestibilidade da alimentação.

[0004] Conseqüentemente, fazendeiros podem tratar alimentos ensilados ou outro alimento de animais com enzimas que degradem fibras, originando-se, principalmente, de fungos, para melhorar a digestibilidade da alimentação. Além disso, existem diversas linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comercialmente disponíveis que, quando fornecidas como alimento a gado melhoraram, reportadamente, a digestão de fibras (Erasmus *et al.*, (1992) *J. Dairy Sci*. 75: 3056-3065; e Wohlt *et al.*, (1998)

J. Dairy Sci. 81: 1345-1352). Uma abordagem alternativa para melhorar a digestão de fibras é a provisão de uma dieta possuindo boas características de digestibilidade inerentes. Para silagem de milho, isso pode incluir silagem de veio foliar principal de milho marrom (Oba & Allen, (1999) *J. Dairy Sci.* 82: 135-142), ou alternativamente, milho híbrido reconhecido como sendo altamente digerível. Ainda, novas tecnologias incorporam gene(s) de fungos responsáveis pela produção de ferulato esterase em tecido vegetal para subseqüente expressão, resultando em melhoramentos na digestibilidade de fibras (WO 02/68666).

[0005] Geralmente, para um animal fazer uso eficiente do alimento que consome, as demandas de energia dos microorganismos no trato digestivos devem ser encontradas e sincronizadas com a disponibilidade de proteínas vegetais. Uma falta de sincronia levará a a) proteínas e outros nutrientes sendo pobremente utilizados no trato digestivo, b) uma perda de nitrogênio, na urina e fezes e c) uma necessidade de dar excessivas quantidades de alimento de concentrados de proteína como suplementos à dieta. O uso de organismos e enzimas pode melhoras ou intensificar o valora da alimentação que os animais recebem e a performance dos animais. Por exemplo, WO 92/10945 descreve tal combinação para uso em intensificar o valor de silagem preparada. WO 93/13786 e WO 96/17525 relatam o melhoramento da performance animal usando microorganismos, enquanto que WO 93/3786 refere-se a uma espécie de *Lactobacillus*. Ainda, foi mostrado que *Lactobacillus*

buchneri é adequado como um alimento microbiano direto para melhorar a performance de um animal (US 6.699.514).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Foi descoberto, agora, que linhagens celulares bacterianas produtoras de ferulato esterase ou mutantes funcionais destas são adequadas para uso como um inóculo de silagem para melhorar a digestibilidade de fibras.

[0007] Foi descoberto, ainda, que a digestão de fibras vegetais em um animal é intensificada fornecendo ao animal uma quantidade efetiva de uma composição contendo ferulato esterase, caracterizado pelo fato de que o ferulato esterase é derivado de uma linhagem bacteriana ferulato esterase ou mutante funcional desta.

[0008] Incorporações da presente invenção provêm métodos de tratar a alimentação animal ou silagem como as linhagens bacterianas produtoras de ferulato esterase aqui descritas, assim como o animal tratado alimentado ou a própria silagem. São também providos métodos de melhorar a performance animal fornecendo a alimentação animal inoculada ou silagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0009] Antes de descrever em detalhe as incorporações da presente invenção, deve ser entendido que as incorporações dessa invenção não estão limitadas a composições ou métodos

particular de melhorar a digestibilidade de forragem ensilada, o que pode, obviamente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia aqui usada é para o propósito de descrever apenas incorporações em particular, e não pretende ser limitante.

[0010] Como usado nessa especificação e nas reivindicações em seguida, as formas no singular "um," "uma" e "o(a)" podem incluir referentes no plural, a menos que o conteúdo indique claramente ao contrário. Assim, por exemplo, referência a "um componente" pode incluir uma combinação de dois ou mais componentes; referência a "alimentação" pode incluir misturas de alimentos, e similares.

[0011] A menos que definido ao contrário, todos termos técnicos e científicos aqui usados possuem o mesmo significado como normalmente entendido por um de habilidade ordinária na arte, à qual as incorporações da invenção pertencem. Vários métodos e materiais similares, modificados, ou equivalentes àqueles aqui descritos podem ser usados na prática das incorporações da presente invenção sem desfazer uma experimentação, os materiais e métodos preferidos estão descritos aqui. Quando descrevendo e reivindicando as incorporações da presente invenção, a seguinte terminologia será usada em concordância às definições expostas abaixo.

[0012] O termo "digestibilidade," como aqui usado, refere-se à habilidade de derivar nutrientes solúveis de um alimento vegetal. A digestibilidade pode ser determinada,

e.g., por análises que provêm dados de testes indicando a quantidade de resíduos de alimento restando em uma digestão e/ou por análises que provêm dados de testes indicando a quantidade de nutrientes liberados de um alimento em uma digestão.

[0013] O termo "disponibilidade de nutriente(s)", como aqui usado, refere-se à quantidade de nutrientes solúveis disponibilizados em uma digestão. A disponibilidade de nutrientes pode ser uma medida da digestibilidade do alimento. A disponibilidade de nutrientes em material vegetal para alimentação pode ser determinada testando-se: materiais vegetais para alimentação, materiais vegetais para alimentação tratados com composições da invenção, materiais vegetais para alimentação ensilados, materiais vegetais para alimentação digeridos *in vitro*, materiais vegetais para alimentação digeridos *in situ*, e/ou similares. Testes para medição de disponibilidade de nutrientes podem incluir, e.g., cromatografia de gás, testes de açúcar, testes de aminoácidos, testes de ácidos graxos livres, testes de ácidos graxos voláteis, testes de carboidratos, e/ou similares.

[0014] O termo "inoculação", como aqui usado, refere-se à introdução de micróbios viáveis a um meio ou material vegetal para alimentação.

[0015] O termo "material vegetal", como aqui usado, refere-se a material de origem vegetal. Material vegetal para

alimentação pode ser material vegetal que pretende ser fornecido como alimento a um animal.

[0016] O termo "meio condicionado", como aqui usado, refere-se a um meio das incorporações da invenção, no qual espécies de bactérias produtoras de ferulato esterase foram cultivadas. Tais meios são ditos de serem condicionados, e.g., pela liberação de metabólitos, inibidores, e/ou enzimas no meio das bactérias produtoras de ferulato esterase.

[0017] Unidades, prefixos, e símbolos podem ser denotados em suas formas SI. Variações numéricas citadas na especificação são inclusivas dos números definindo a variação e incluem cada número inteiro na variação definida.

[0018] Como aqui usado, “mutante funcional” significa uma linhagem bacteriana diretamente ou indiretamente obtida por modificação genética de, ou usando, a(s) linhagem(s) referência(s) e retendo ao menos 50% da atividade de uma silagem controle usando a linhagem referenciada. A modificação genética pode ser alcançada através de várias maneiras, tais como, mas não limitando-se a, mutagênicos químicos, radiação ionizante, mutagênese baseada em *transposon*, ou *via* conjugação, transdução, ou transformação usando as linhagens referenciadas tanto como o recipiente ou doados de material genético.

[0019] Como aqui usado, “isolado” significa removido de uma fonte natural, tal como de uma silagem não inoculada ou outro material vegetal.

[0020] Como aqui usado, “purificada” significa que uma espécie de bactéria ou linhagem é substancialmente separada de, e enriquecida relativamente a: leveduras, fungos, e/ou outras espécies de bactérias ou linhagens encontradas na fonte da qual foi isolada.

[0021] Como aqui usado, “performance animal” significa a produção de carne, leite, ovos, prole, ou trabalho.

[0022] O termo “silagem” como aqui usado pretende incluir todos tipos de produtos agrícolas fermentados, tais como silagem de gramíneas, silagem de alfafa, silagem de trigo, silagem de leguminosa, silagem de girassol, silagem de cevada, silagem de pé-de-milho (WPCS), silagem de sorgo, misturas de grãos e grama fermentados, etc.

[0023] Como aqui usado, “material vegetal pré-ensilado” significa gramíneas, milho, alfafa e outros legumes, trigo, sorgo, girassol, cevada e misturas destas. Todas as quais podem ser tratadas com sucesso como os inóculos com os inóculos das incorporações da presente invenção. Os inóculos das incorporações da presente invenção são também úteis para tratar milho de alta mistura (HMC).

[0024] Uma incorporação da invenção é uma composição para uso como inóculo de silagem compreendendo uma linhagem

bacteriana produtora de ferulato esterase ou uma mutante funcional desta e um carregador adequado. Linhagens celulares bacterianas produtoras de ferulato esterase adequadas ou mutantes funcionais destas incluem linhagens de *Lactobacillus*. Linhagens de *Lactobacillus* produtoras de ferulato esterase ou mutantes funcionais desta incluem *Lactobacillus buchneri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta. Linhagens adequadas produtoras de ferulato esterase de *Lactobacillus buchneri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta incluem *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6138, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6134, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6136, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6137, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP7109, depositada como Depósito para fins de patente No.

PTA-6139, *Lactobacillus brevis*, linhagem LB1154, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30865, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional B-30866, *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30867, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2127, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30868, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30869, *Lactobacillus crispatus* linhagem LI2366, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30870, *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30871, e misturas destas.

[0025] Em uma incorporação da invenção, a composição contém entre cerca de 10^1 a cerca de 10^{10} de organismos viáveis de linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado. Em uma incorporação da invenção adicional, a composição contém entre cerca de 10^2 a cerca de 10^7 de organismos viáveis da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado. Ainda, em uma incorporação adicional, a composição contém entre cerca de 10^3 a cerca

de 10^6 de organismos viáveis da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado.

[0026] Carregadores adequados são tanto líquidos como sólidos e são bem conhecidos por aqueles especialistas na arte. Por exemplo, carregadores sólidos podem ser feitos de carbonato de cálcio, amido, celulose e combinações destes.

[0027] Uma incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6138. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6134. Outra incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6136. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779 tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6137. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP7109 tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6139. Outra incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6135. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus brevis*,

linhagem LB1154, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30865. Outra incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30866. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30867. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2127, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30868. Outra incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30869. Uma incorporação adicional da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2366, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30870. Outra incorporação da invenção é uma cultura biologicamente pura de *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30871.

[0028] Um depósito dos seguinte microorganismos foi feito na American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209: *Lactobacillus buchneri* LN4017 (número de acesso ATCC Accession No. PTA-6138), *Lactobacillus plantarum* LP678 (número de acesso ATCC Accession No. PTA-6134), *Lactobacillus plantarum* LP3710 (número de acesso ATCC Accession No. PTA-6136), *Lactobacillus plantarum* LP3779 (número de acesso ATCC Accession No. PTA-6137), *Lactobacillus plantarum* LP7109 (número de acesso ATCC Accession No. PTA-6139), e

Lactobacillus paracasei tolerans LC3200 (número de acesso ATTC Accession No. PTA-6135). Esses organismos foram depositados em 3 de agosto de 2004. Os microorganismos depositados na ATCC foram retirados do mesmo depósito mantido na Pioneer Hi-Bred International, Inc (Des Moines, IA). Solicitante(s) encontrarão todos os requerimentos de 37 C.F.R. § 1.801 - 1.809, incluindo provir uma indicação da viabilidade da amostra quando o depósito é feito. Cada depósito será mantido sem restrição no depositório da ATCC, o qual é um depositório público, por um período de 30 anos, ou 5 anos após o pedido mais recente, ou pela vida útil da patente, o que quer que seja mais duradouro, e será substituído caso se torne inviável durante aquele período. Contudo, deveria ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para a prática da presente invenção em depreciação dos direitos de patente concedidos por ação governamental.

[0029] As linhagens indicadas abaixo foram depositadas em 6 de agosto de 2005 na Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection, hospedado na Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit do National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), sob as provisões do tratado de Budapeste. Às linhagens foram dadas os seguintes números de acesso. O endereço de NCAUR é 1815 N. University Street, Peoria, IL, 61604. Os depósitos estarão disponíveis ao público, irrevogavelmente e sem restrição ou condição, com a emissão de uma patente. Contudo, deveria ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a presente invenção em

depreciação de direitos de patente concedidos por ação do governo:

Lactobacillus brevis LB1154, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30865;

Lactobacillus buchneri LN4888, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30866;

Lactobacillus reuteri LR4933, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30867;

Lactobacillus crispatus LI2127, ARS Accession No. NRRL B-30868;
Lactobacillus crispatus LI2350, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30869;

Lactobacillus crispatus LI2366, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30870.

[0030] A linhagem indicada abaixo foi depositada em 16 de agosto de 2005 na Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection, hospedada na Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit do National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), sob as provisões do tratado de Budapeste. A linhagem recebeu o número de acesso indicado. O endereço de NCAUR é 1815 N. University Street, Peoria, IL, 61604. O depósito estará disponível ao público, irrevogavelmente e sem restrição ou condição, com a emissão de uma patente.

[0031] Contudo, deveria ser entendido que a deveria ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a presente invenção em depreciação de direitos de patente concedidos por ação do governo:

> *Lactobacillus* de espécie desconhecida UL3050, número de acesso ARS Accession No. NRRL B-30871.

[0032] É também descrito um método para tratar material vegetal pré-ensilado para intensificar a digestibilidade da silagem resultante através de adição, ao material vegetal pré-ensilado, de uma quantidade intensificadora de digestibilidade de silagem da composição contendo a linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase, ou uma mutante funcional desta. Materiais vegetais pré-ensilados incluem gramíneas, milho, alfafa e outras leguminosas, trigo, sorgo, girassol, cevada e misturas destas.

[0033] Uma incorporação da invenção é um método para intensificar a digestão de fibras vegetais em um animal, fornecendo, ao animal, uma quantidade efetiva de uma composição contendo ferulato esterase, caracterizado pelo fato de que a ferulato esterase é derivada de uma linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou uma mutante funcional desta. Linhagens celulares bacterianas produtoras de ferulato esterase ou mutantes funcionais destas adequadas incluem linhagens de *Lactobacillus*. Linhagens adequadas de *Lactobacillus* incluem *Lactobacillus*

buchneri ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta. Suitable *Lactobacillus buchneri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta incluem *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6138, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6134, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6136, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6137, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP7109, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6139, *Lactobacillus brevis*, linhagem LB1154, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30865, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL B-30866, *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30867, *Lactobacillus*

crispatus, linhagem LI2127, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30868, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30869, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2366, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30870, *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30871, e misturas destas.

[0034] A composição que é fornecida ao animal foi tratada com uma quantidade catalítica efetiva da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta, como é prontamente determinável por aqueles especialistas na arte em criação animal. Animais que são beneficiados por incorporações da presente invenção são mamíferos e aves, incluindo, mas não limitando-se a, ruminantes, eqüinos, bovinos, suínos, caprinos, ovinos e espécies de aves, e.g., aves domésticas.

[0035] Uma incorporação adicional da invenção é uma composição para uso como inóculo de silagem compreendendo uma quantidade intensificadora de digestibilidade de silagem de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6135 ou uma mutante funcional desta, a linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou uma mutante funcional desta, e um carregador adequado. Linhagens

celulares bacterianas produtoras de ferulato esterase adequadas ou mutantes funcionais destas incluem linhagens de *Lactobacillus*. Linhagens produtoras de ferulato esterase adequadas de *Lactobacillus* strains ou mutantes funcionais desta incluem *Lactobacillus buchneri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta. Linhagens de *Lactobacillus buchneri* adequadas produtoras de ferulato esterase ou mutante funcional desta, *Lactobacillus plantarum* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus brevis* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus reuteri* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus alimentarius* ou mutante funcional desta, *Lactobacillus crispatus* ou mutante funcional desta, e *Lactobacillus paralimentarius* ou mutante funcional desta, incluem *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6138, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6134, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6136, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6137, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP7109, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6139, *Lactobacillus brevis*, linhagem LB1154, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30865,

Lactobacillus buchneri, linhagem LN4888, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30866, *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30867, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2127, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30868, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30869, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2366, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30870, *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30871, e misturas destas.

[0036] Em uma incorporação da invenção a composição contém entre cerca de 10^1 a cerca de 10^{10} de organismos viáveis de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^1 a cerca de 10^{10} de organismos viáveis da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado. Em uma incorporação adicional da invenção, a composição contém entre cerca de 10^2 a cerca de 10^7 de organismos viáveis de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^2 a cerca de 10^7 de organismos viáveis da linhagem bacteriana

produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado. Ainda, em uma incorporação adicional da invenção a composição contém entre cerca de 10^3 a cerca de 10^6 de organismos viáveis de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^3 a cerca de 10^6 de organismos viáveis da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase ou mutante funcional desta por grama de material vegetal pré-ensilado.

[0037] Uma incorporação da invenção é uma linhagem substancialmente purificada de uma bactéria selecionada do grupo consistindo de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6138, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6134, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6136, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6137, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP7109, depositada como Depósito para fins de patente No. PTA-6139, *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 tendo o número de acesso ATCC Accession No. PTA-6135, *Lactobacillus brevis*, linhagem LB1154, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30865, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL B-30866, *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933,

depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30867, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2127, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30868, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30869, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2366, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30870, *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, depositada como Depósito para fins de patente na Autoridade Depositária Internacional NRRL No. B-30871, e misturas destas.

[0038] Em uma incorporação adicional da invenção *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 em combinação com *Lactobacillus buchneri* linhagem LN4017, não apenas intensifica a digestão de fibras vegetais em animais, mas a combinação também intensifica a preservação da forragem ensilada melhorando ambas fermentação e estabilidade aeróbica da silagem. Em uma incorporação adicional da invenção *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 em combinação com *Lactobacillus plantarum* linhagem LP3779 não apenas intensifica a digestão de fibras vegetais em animais, mas a combinação também intensifica a preservação da forragem ensilada melhorando a fermentação da silagem. Em uma incorporação adicional da invenção *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 em combinação com *Lactobacillus plantarum* linhagem LP7109 não apenas intensifica a digestão de fibras vegetais em

animais, mas a combinação também intensifica a preservação da forragem ensilada melhorando a fermentação da silagem. Em outra incorporação da invenção *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 em combinação com *Lactobacillus buchneri* linhagem LN4017 e *Lactobacillus plantarum* linhagem LP7109 não apenas intensifica a digestão de fibras vegetais em animais, mas a combinação também intensifica a preservação da forragem ensilada melhorando ambas fermentação e estabilidade aeróbica da silagem. Métodos de usar culturas misturadas para melhorar tanto a fermentação ou estabilidade aeróbica de silagem são descritos em US 6.403.804.

[0039] Incorporações da presente invenção são ainda definidas nos seguintes exemplos. Deveria ser entendido que esses exemplos, enquanto indicando certas incorporações da invenção, são fornecidos para fins de ilustração apenas. A partir da discussão acima e desses exemplos, um especialista na arte pode averiguar as características essenciais dessa invenção, e sem deixar o espírito e escopo desta, pode fazer várias mudanças e modificações das incorporações da invenção para adaptá-la a vários usos e condições. Assim, várias modificações das incorporações da invenção, além daquelas aqui mostradas e descritas, serão aparentes àqueles especialistas na arte, a partir da precedente descrição. É pretendido que tais modificações também caiam no escopo das reivindicações em seguida.

[0040] A descrição de cada referência aqui relatada é aqui incorporada por referência em sua integridade.

Exemplo 1 – Efeito de Aditivos de Silagem na Digestibilidade Nutrientes em Carneiros

[0041] Plantas de milho para forragem (WPCF) foram colhidas inteiras com um cutelo marca John Deere 3950 para forragem, o tamanho teórico do cutelo de forragem foi de 3/8 a 1/2 polegada (0,95 a 1,27 cm). Os tratamentos com inóculos de *Lactobacillus paracasei tolerans* 3200 (LC3200) ou *Lactobacillus buchneri* 4017 (LN4017), (LC3200 ou LN4017) foram cultivados e colhidos por métodos aceitos na indústria conhecidos na arte. Os tratamentos com inóculos foram aplicados e misturados na forragem a medida que uma esteira transportadora derramava a forragem nos silos. Os tratamentos foram aplicados na forma solúvel para suprir 10^5 unidades de colônias se formando/grama (cfu/g) de forragem para ambos tratamentos com inóculos. Uma pessoa caminhando pelo topo de cada silo a medida que os silos eram completamente preenchidos a uma densidade similar. Os silos foram selados com uma camada plástica e foi aplicada, a cada silo, uma tampa de compensado pesado com um peso de concreto de 500 libras (226 kg).

[0042] A dieta teste fornecida a carneiros consistiu de 90% de plantas de milho para forragem inteiras (WPCS) e 10% suplemento (42% farinha de proteína de soja) em uma base de matéria seca (DM), e foi fornecida duas vezes ao dia.

[0043] O estudo de digestão foi conduzido com carneiros alimentados pesando, em média, aproximadamente 50-70 libras

(26,6 a 31,64 kg). Doze carneiros foram assinalados por peso para cada tratamento; a ingestão da dieta foi estabelecida a 1,5X de manutenção. Um período de ajuste à dieta foi permitido por 7 dias seguido de um período de coleta de 5 dias. Isso foi repetido para aumentar o número de repetições do tratamento. Amostras de silagem foram compostas em uma base diária por tratamento. Fezes e urina foram coletados diariamente e compostas por carneiro.

[0044] Amostras de silagem retiradas periodicamente durante o estudo de alimentação foram avaliadas para DM, pH, nitrogênio total, fibras neutras de detergente (NDF), fibras ácidas de detergente (ADF), concentrações de ácido lático e de ácidos graxos voláteis (VFA).

[0045] As silagens foram todas bem fermentadas como ilustrado pelo baixo pH e altas concentrações de ácido lático, como apresentado na Tabela 1. O valor de pH de forragem inoculada como homofermentativo de linhagem LC3200 na ensilagem foi menor que aquele dos tratamentos controle e LN4017. Conseqüentemente, o tratamento LC3200 teve uma maior concentração de ácido lático e uma maior recuperação de matéria seca do que as silagens não tratadas ou LN4017, e essas observações foram consistentes com os efeitos conhecidos de inóculos de silagem homofermentativos eficazes.

Tabela 1. DM, composição química da silagem(% DM) e pH

Item[1]	Controle	LC3200	LN4017
Matéria seca	28,7	29,1	28,8
Recuperação de DM	89,5	92,2	89,8
pH	3,63	3,54	3,62
Ácido lático	5,23	6,10	5,57
Ácido acético	1,83	1,43	2,03
Ácido propiônico	0,02	0,03	Nd
Ácido butírico	Nd	Nd	Nd
Ácido isobutírico	0,23	0,15	0,26
Nitrogênio total	1,21	1,18	1,22
NDF	42,5	42,9	43,7
ADF	27,9	28,6	28,8

[1] Valores expressos como médias *least squares*.

nd = não detectado

[0046] Como apresentado na Tabela 2, inóculos aumentaram a digestibilidade de DM e N quando comparado à forragem controle (não-inoculada). Coeficientes de digestibilidade para NDF e ADF foram maiores em forragens inoculadas quando comparados ao controle. Em particular, LN4017 aumentou a digestibilidade de NDF por 4,3 pontos percentuais (ou 8.7%)

e digestibilidade de ADF por 6.3% pontos percentuais (ou 13%).

Tabela 2. Resultados do teste de digestão em carneiros

Item[1]	Controle	LC3200	LN4017
Numero de animais	12	12	12
Peso do Animal, libras	69,1	67,7	68,9
Ingestão de matéria seca, g/d	557	541	545
Digestibilidade, %			
Matéria seca	67,9	69,1	69,4
Nitrogênio	67,8	69,7	69,9
NDF	49,2	51,7	53,5
ADF	46,7	49,9	53,0

[1] Valores expressos como médias *least squares*.

Exemplo 2 – Efeito de Aditivos de Silagem na Digestibilidade de Nutrientes em Carneiros

[0047] Plantas de milho para forragem (WPCF) foram colhidas inteiras com um cutelo marca John Deere 3950 para forragem, o tamanho teórico do cutelo de forragem foi de 3/8 a 1/2 polegada (0,95 a 1,27 cm). O milho foi colhido a aproximadamente ⅔ da linha de leite. Os tratamentos foram

silagem não-tratada (Controle), e silagem tratada com *Lactobacillus paracasei tolerans* 3200 (LC3200) ou *Lactobacillus buchneri* 4017 (LN4017), ambos aplicados a uma taxa de $1x10^5$ cfu/g de forragem. A forragem de milho foi golpeada em um vagão de forragem marca John Deere. Os tratamentos foram aplicados na forma solúvel para a forragem a medida que a forragem foi derramada no silo por uma esteira. Os silos foram preenchidos tendo uma pessoa caminhado pelo topo na forragem a medida que era derramada no silo. Os silos foram selados com uma camada de plástico e uma tampa de compensado pesado com um peso de concreto de 500 libras (226 kg).

[0048] Amostras para análise de nutrientes foram retiradas de cada silo à medida que era fornecida para o estudo de digestão em carneiros. Esses resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Química final da silagem.

Item[1]	Controle	LC3200	LN4017
Matéria seca, %	37,19	36,98	35,67
PH	3,8	3,8	3,7
Recuperação de matéria seca, %	99,75	97,78	96,11
		% DM	
Total nitrogênio	1,16	1,15	1,21
NDF	36,55	36,74	36,44

ADF	19,31	19,04	19,47
Ácido lático	4,01	4,33	4,16
Ácido acético	0,74	0,81	1,26
Ácido propiônico	0,01	0,01	0,01
Ácido butírico	0,01	0,01	0,01
Ácido isobutírico	0,01	0,01	0,01

[1] Valores expressos como médias *least squares*.

[0049] Um estudo de digestão foi conduzido com doze carneiros com um peso médio de aproximadamente 70 libras (31,64 kg). Doze carneiros foram assinalado por peso para cada tratamento. A ingestão foi estabelecida a 1.2X do requerimento de manutenção para cada carneiro. A ração foi fornecida duas vezes ao dia e consistiu de 90% de silagem de milho e 10% suplemento (42% farinha de proteína de soja) em uma base de matéria seca como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Químicas da rações.

Item[1]	Controle	LC3200	LN4017
Matéria seca, %	39,57	39,08	37,61
		% DM	
Nitrogênio Total	3,88	3,54	4,00
NDF	76,48	75,96	67,54
ADF	44,74	42,38	38,70

[1] Valores expressos como médias *least squares.*

[0050] Os carneiros foram colocados em caixotes de metabolismo, e um período de adaptação de sete dias foi seguido de um período de coleta de cinco dias. As quantidade fornecidas foram gravadas. Recusas foram coletadas, pesadas e compostas. Um bloco de sal/mineral foi provido para cada carneiro e carneiros tinham acesso ilimitado a água. Amostras de silagem foram compostas diariamente por tratamento. Amostras de fezes foram compostas diariamente por carneiro. Uma porcentagem do total diário de urina foi coletada diariamente e composta por carneiro.

[0051] Coeficientes de digestão são mostrados na Tabela 5. A digestibilidade de nitrogênio foi maior para silagem tratada com LN4017 quando comparada com a silagem não-tratada (Controle). A digestibilidade de ADF e NDF foi maior para silagem tratada com LN4017 quando comparada com a silagem não-tratada (Controle).

Tabela 5. Resultados do teste de digestão em carneiros.

Item[1]	Controle	LC3200	LN4017
Número de animais	12	12	12
Peso do animal, libras	70,6	70,5	70,2
Ingestão de matéria seca, g/d	2872	2833	2719

Composição da dieta			
Silagem de milho, DM%	90	90	90
Suplemento, DM%	10	10	10
Digestibilidade, %			
Matéria seca	71,81	72,70	73,46
Nitrogênio	45,89	49,55	52,48
NDF	53,86	56,41	57,53
ADF	43,84	44,51	46,50

[1] Valores expressos como médias *least squares.*

Exemplo 3 – Efeito de Aditivos de Silagem na Digestibilidade de Nutrientes em Novilhos de Corte

[0052] Plantas de milho para forragem (WPCF) foram colhidas inteiras com um cutelo marca John Deere 3950 para forragem, o tamanho teórico do cutelo de forragem foi de 3/8 a 1/2 polegada (0,95 a 1,27 cm). O milho foi colhido a um conteúdo de mistura de 66.66% e a aproximadamente ⅔ da linha de leite. Dezoito silos de 2 toneladas foram designados para cada tratamento. Os tratamentos foram como se segue: silagem não-inoculada (Controle) e uma combinação de LC3200 aplicada a $2x10^4$ cfu/g de forragem e LN4017 aplicada a $1x10^5$ cfu/g de forragem (LC3200 + LN4017). A forragem de milho foi golpeada em um vagão de forragem marca John Deere.

[0053] Os tratamentos foram aplicados na forma solúvel para a forragem, à medida que a forragem foi derramada no silo por uma esteira. Os silos foram preenchidos tendo uma pessoa caminhado pelo topo na forragem à medida que era derramada no silo. Um silo de cada tratamento foi preenchido de forragem uma carga de vagão; a ordem de preenchimento foi alternada para cada grupo de silos preenchidos. Os silos foram selados com uma camada de plástico e uma tampa de compensado pesado com um peso de concreto de 500 libras (226 kg). Amostras foram retiradas de casa silo para análise de nutrientes à medida que foram fornecidas para o estudo de performance em novilhos.

[0054] Quarenta (40) cabeças de novilhos do tipo para corte, tendo em média aproximadamente 702 libras (317 kg), fora repartidos por peso em dois (2) tratamentos para um estudo de alimentação de 56 dias. Quatro (4) novilhos foram designados a um estábulo, com cinco estábulos aleatoriamente designados para cada tratamento. O gado foi pesado no início (dias −1 e 0), meio (dia 28) e final do estudo (dia 56). Os novilhos foram pesados seguindo um emagrecimento de 2 dias; o gado foi emagrecido cortando-se a alimentação para 50% e removendo água por 16 horas cada dia. O ganho total e ganho médio diário foram calculados para todo o período de alimentação.

[0055] Os novilhos foram alimentados duas vezes ao dia via portões Calan™. O sistema Calan™ Gate System permitiu a alimentação de animais em base individual, permitindo, ao animal, acesso a apenas a sua própria cocheira de

alimentação. Foi permitido, aos animais, o acesso a água fresca e blocos de sal/mineral em todos os momentos. As quantidades fornecidas foram anotadas e recusas foram coletadas, pesadas e compostas, se necessário. Amostras da ração foram compostas para determinação de matéria seca para calcular a ingestão de matéria seca.

[0056] As químicas nutricionais da silagem são apresentadas abaixo na Tabela 6. A recuperação de matéria seca foi numericamente maior para silagens tratadas com LN4017+LC3200 e esse efeito é consistente com a presença e atividade de LC3200. Da mesma maneira, as concentrações de ácido acético foram maiores em silagens tratadas com LN4017+LC3200 do que no controle e essa diferença pode ser atribuída à atividade de LN4017 heterofermentativa.

Tabela 6. Químicas finais de silagem.

Item[1]	Controle	LC3200 + LN4017
Matéria seca, %	31,94	31,94
pH	3,72	3,76
Recuperação de matéria seca, %	92,88	94,13
	% DM	
Total nitrogênio	1,23	1,36
NDF	42,77	41,22
ADF	27,62	25,86

Ácido lático	4,50	4,07
Ácido acético	1,15	1,83
Ácido propiônico	nd	nd
Ácido butírico	nd	nd
Ácido isobutírico	nd	nd
Amônia N	13,03	13,01
Etanol	1,22	1,10

nd=não detectável

[1] Valores expressos como médias *least squares*.

[0057] As químicas das rações são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7. Composição de nutrientes analisadas das dietas fornecidas aos novilhos

Item	Controle	LC3200 + LN4017
Matéria seca, %	34,36	33,94
	% DM	
Nitrogênio total	1,85	1,97
NDF	36,39	36,43
ADF	23,31	25,90

[0058] Os dados de performance dos novilhos são apresentados na Tabela 8. O ganho de peso/tonelada de forragem ensilada foi aproximadamente 12 libras maior para os novilhos alimentados com silagem inoculada com LC3200

+LN4017, quando comparados aos novilhos alimentados com dieta não-inoculada (Controle).

Tabela 8. Performance de novilhos alimentados com dietas teste

Item	Controle	LC3200 + LN4017
Número de animais	20	20
Dias no teste	56	56
Peso inicial, libras	704,6	701,1
Peso final, libras	861,8	868,4
Ganho médio diário, libras	2,81	2,99
Eficiência de alimentação	5,74	5,25
Ingestão de matéria seca, libras	15,8	15,5
% de ingestão metabólica	87,6	85,6
Matéria seca de silagem, %	31,94	31,94
Composição de dieta		
Silagem WPCS, % da dieta DM	88,0	88,0
Suplemento, % da dieta DM[1]	12,0	12,0
Recuperação de matéria seca, %	92,88	94,13

Ganho/tonelada de silagem WPCS fornecida, libras	128,7	140,2
Ganho/tonelada de forragem ensilada, libras	119,5	132,0

[1]Suplemento 42/17 R200 continha: proteína crua, mínimo de 42% com não mais que 17% de proteína equivalente a partir de nitrogênio não-protéico; gordura crua, 1,25%; fibras cruas, 5%; cálcio, 5%; fósforo, 1,5%; sais, 2,5%; potássio, 1,2%; vitamina A, 48.000 IU/lb; vitamina D, 4800 IU/lb; vitamina E, 48 IU/lb; Monensina, 200 g/ton.

Exemplo 4 - Efeitos de um Aditivo de Silagem na Fermentação e Estabilidade Aeróbica de Silagem de Milho

[0059] Quatro (4) híbridos de milho marca Pioneer®: 33P67, 34G13, 37B35 e 34G13 (Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, IA) foram colhidos com valores respectivos de matéria seca de 38,4, 32,1, 39,5, 31,8 e 36,0%, e ensilados com ou sem inoculação como nos experimentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

[0060] *Lactobacillus buchneri* linhagem LN4017 e *Lactobacillus paracasei tolerans* linhagem LC3200 foram cultivados, estabilizados e liofilizados como conhecido na arte. Os tratamentos foram controle (não-tratado), LN4017 e LN4017+LC3200. LN4017 foi aplicada a forragem como uma solução aquosa para entregar $1x10^5$ CFU/g de forragem quando aplicada a uma taxa de 2,2 mL/kg sozinha ou em combinação

com LC3200. *Lactobacillus paracasei tolerans* linhagem LC3200 foi usado apenas em combinação com LN4017 e aplicado para entregar 2 x 10^4 cfu/g quando aplicada a uma taxa de 2,2 mL/kg. Todos tratamentos foram aplicados por dispersão com seringa *via* uma agulha de indicador 16, e cuidadosamente misturadas na forragem enrolando em filme plástico limpo.

[0061] Para cada tratamento, 4 4”x14” silos de tubo de cloreto de polivinil (PVC) experimentais foram preenchidos e empacotados a densidade máxima de preenchimento de 70% (aproximadamente 160 kg DM M^3), usando uma prensa hidráulica. Os silos experimentais foram ajustados com tampas de borracha em cada extremidade, e a tampa do topo foi equipada com uma válvula Bunsen para permitir o escape de gases.

[0062] Os silos foram abertos após 50-57 dias, esvaziados e a forragem cuidadosamente misturada. Amostras de silagem foram repartidas para as várias análises, isto é: pH, matéria seca e estabilidade aeróbica. DM da silagem foi determinada secando-se a um peso constante em um forno de ar forçado a 62 °C. Avaliações de estabilidade aeróbica foram conduzidas em réplicas individuais dos tratamentos usando o procedimento de Honig (Proc. Of the Eurobac. Conf., P. Lingvall & S. Lindgren (ed.) (12-16 de agosto de 1986) Swed. Univ. of Agric. Sci. Grass and Forage Report No. 3-1990. Pp. 76-81. Uppsala, Sweden.).

[0063] O tempo (h) para a temperatura da silagem se elevar 1,7 °C acima da ambiente foi anotado (ROT). A integração da área entre a curva real de temperatura de silagem e a linha desenhada pela temperatura ambiente (Cumm-DD) foi calculada.

[0064] A tabela 9 mostra os efeitos dos inóculos no pH e estabilidade aeróbica de silagem na abertura dos silos. As silagens foram bem fermentadas, como ilustrado pelos valores de pH, os quais variaram entre 3,77-4,22 (Exp. 1), 3,81-3,90 (Exp. 2), 3,85-3,92 (Exp. 3) e 3,74-3,93 (Exp. 4). A inoculação com LN4017+LC3200 aumentou o pH de silagem no Exp. 1, mas teve pouco ou nenhum efeito nesse parâmetro em qualquer dos outros experimentos.

[0065] As silagens controle foram relativamente aerobicamente estáveis no Exp. 1 e Exp. 4 (valores de 90 e 72, respectivamente) mas instáveis para os outros 2 experimentos (valores de ROT <33 h). LC3200+LN4017 melhorou a estabilidade aeróbica (ROT) por entre 42 e 128 horas em todos os quatro (4) experimentos. A combinação de *L. buchneri* linhagem LN4017 e *L. paracasei tolerans* linhagem LC3200 foi, em média, numericamente mais efetiva em melhorar a estabilidade aeróbica do que a inoculação com LN4017 sozinha. Os valores de Cumm-DD refletiram ROT e, portanto, suportaram conclusões feitas usando ROT em relação à estabilidade de silagens na abertura.

[0066] A inoculação de WPC com inóculos contendo *Lactobacillus buchneri* linhagem LN4017 produtora de

ferulato esterase resultou em silagens bem fermentadas, com uma estabilidade aeróbica melhorada em todos os quatro (4) experimentos. Quando comparado ao controle, a combinação de LN4017 e LC3200 foi numericamente mais efetiva para a melhora da estabilidade aeróbica (de 42 a 128 h) do que LN4017 sozinha (de 3 a 90 h) demonstrando a presença de uma interação positiva entre LC3200 e LN4017.

Tabela 9. Efeitos de LN4017+LC3200 no pH e estabilidade aeróbica de WPCS

Tratamento[1]	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3				Experimento 4			
	pH	DM	ROT[2]	Cumm-DD[3]	pH	DM	ROT	Cumm-DD	pH	DM	ROT	Cumm-DD	pH	DM	ROT	Cumm-DD
Controle	3,81	33,6	90	68	3,89	31	21	76	3,88	39	32	83	3,86	32	72	70
LN4017	3,93	31,9	134	13	3,85	33	24	7	3,88	37	78	14	3,84	32	129	17
LN4017+LC3200	4,22	33,3	132	13	3,85	31	126	0	3,88	37	100	5	3,83	32	160	0

[1]os valores são medias de 4 repetições experimentais.

[2]Tempo em horas para a silagem se elevar 1,7 °C acima da temperatura ambiente.

[3]Integração da área entre a curva de temperatura real e uma linha desenhada pela temperatura ambiente.

Exemplo 5 - Determinação de atividade de ferulato esterase

[0067] Culturas bacterianas de ácido lático, retiradas da coleção microbiana da Pioneer Hi-Bred, foram cultivadas em caldo De Man Rogosa Sharpe (caldo MRS; Difco™ Lactobacilli MRS; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA), preparado como descrito pelo fabricante, por 24 a 48 horas. As células bacterianas foram colhidas do caldo MRS (10 mL) por centrifugação (3200 x g; 20 minutos) e re-suspendidas em 1 mL de tampão de lise consistindo de 100 mM HEPES (pH 7.0), azida de sódio (10 µg /mL) e 5 µL de DNase (Roche Diagnostics corporation, Indianapolis, IN). As células foram lisadas usando uma prensa French Press (French Press Cell, Pressure, SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Inc., Rochester, NY) como é conhecido na arte. Esses lisados de células microbianas foram, então, testados para atividade de ferulato esterase como descrito abaixo.

[0068] O substrato para atividade de ácido ferúlico esterase (4-nitrofenil ácido ferúlico) for adquirido do Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences Dubravska, Cesta 9, 845 38, Slovakia. Atividades de ferulato esterase de lisados de células microbianas foram determinadas usando o teste descrito por Mastihuba *et al.* (2002, *Analytical Biochemistry* 309, 96-101) com modificações como detalhado abaixo.

[0069] O substrato foi primeiro dissolvido em dimetillsulfóxiod como descrito por Mastihuba *et al.* (2002, *supra*) e, então, diluído para a solução de substrato de

trabalho final de 2,5 mM em 0,5M KPO_4; pH 7,0. Oitenta microlitros (80 µL) da solução de substrato foi dispensado em uma placa poço 96 de microtitulação contendo vinte microlitros (20 µL) de lisados de células preparados acima e as soluções foram cuidadosamente misturadas e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Poços controle consistindo de solução de substrato em tampão (2,5 mM em 0,5M KPO_4; pH 7,0) e lisados de células em tampão foram incluídos e, de outra forma, tratados da mesma maneira como as misturas de reação. Seguindo o período de incubação, 20 µL da mistura de reação ou poços controle foram retirados usando uma micropipeta de 8 canais e adicionados a um poço de placa de microtítulo contendo 180 µL de KPO_4 (pH 8). O volume final em cada poço de placa de microtítulo foi de 200 µL. As soluções foram misturadas cuidadosamente e suas densidades óticas determinadas a 405 nm usando um leitor de placa de microtítulo (Vmax Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices, Menlo Park CA). As leituras de absorbância da mistura de reação foram corrigidas para leituras de absorbância dos controles preparados como descrito acima. P-nitrofenol (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,25 mM em 0,5 M KPO_4 (pH 8); 200 µL (Sigma Chemical Company, St Louis, MO; Cat #104-8) foram usados como um padrão para o teste de ferulato esterase. As concentrações de proteína das células foram determinadas usando reagente Bradford como é conhecido na arte (Sigma Chemical Company., St Louis MO; Cat #B 6916; Bradford, M, (1976) Analytical Biochemistry 72 248-254). Atividades de ferulato esterase dos lisados de células foram expressas como nanomoles de P-nitrofenil (pNP) liberados por minuto por mg de proteína.

Tabela 10. Atividade de ferulato esterase de bactérias de ácido lático.

Número de Identificação da linhagem	FEA[1] (nanomoles pNP[2] Liberados/mg proteína/min.)
Lactobacillus buchneri linhagem LN4017	14,0
Lactobacillus buchneri linhagem LN4888	23,0
Lactobacillus reuteri linhagem LR4933	5,94
Lactobacillus brevis linhagem LB1154	2,17
Lactobacillus crispatus linhagem LI2127	10,1
Lactobacillus crispatus linhagem LI 2366	7,77
Unknown *Lactobacillus* linhagem UL3050	5,11
Lactobacillus crispatus LI2350	6,86
Lactobacillus plantarum strain 3710	2,68
Lactobacillus plantarum strain 3779	2,26
Lactobacillus plantarum strain 7109	1,69

[1]FEA, Atividade de ferulato esterase; os dados são médias de 3 experimentos independentes.

[2]pNP, P-nitrofenol

[0070] Atividades de ferulato esterase de bactérias de ácido lático (Tabela 10) variaram de 1,69 a 23,0 nanomoles p-nitrofenol liberados por mg de proteína por minuto.

Exemplo 6 - Efeitos da inoculação com bactérias de ácido lático produtoras de ferulato esterase no pH e digestibilidade de matéria seca de silagem de plantas de centeio e fibras

[0071] O centeio foi do primeiro corte da primavera, colhido no Pioneer Livestock Nutrition Center (PLNC), Sheldahl, IA em junho de 2005. As linhagens teste foram tanto cultivadas e congeladas por um fabricante de contrato da Pioneer Hi-Bred International, Inc. ou usada como culturas frescas de 24-48 horas cultivadas em caldo MRS como é conhecido na arte. As linhagens teste foram todas bactérias produtoras de ferulato esterase como determinado por método de pNP-ácido ferúlico (ver Exemplo 5, Tabela 10).

[0072] Foram determinados os efeitos da inoculação com linhagens produtoras de ferulato esterase de *Lactobacillus crispatus* linhagem LI2127, *Lactobacillus crispatus* linhagem LI2350, *Lactobacillus* desconhecido linhagem UL3050, *Lactobacillus crispatus* linhagem LI2366; *Lactobacillus brevis* linhagem LB1154; *Lactobacillus buchneri* linhagens LN4017 e LN4888; e *Lactobacillus reuteri* linhagem LR4933 na matéria seca de silagem de centeio e digestão de fibras com detergente neutro (DMD e NDFD, respectivamente).

[0073] O centeio foi tanto deixado sem ser inoculado (controle) ou inoculado com as linhagens teste como aqui descrito previamente. Todas linhagens teste foram aplicadas para forrage a uma taxa estimada de $1x10^5$ cfu/g

de peso fresco. Adicionalmente, todas linhagens teste foram aplicadas à forragem como soluções aquosas (10 mL/4,54 Kg peso de forragem fresca) e cuidadosamente misturadas com a forragem em uma sacola plástica de 30 galões (114 litros).

[0074] A forragem, 1,36 Kg foi ensilada, em triplicata para cada tratamento, em silos pacotes de polietileno que foram empacotados a vácuo e selados por calor como descrito por Dennis *et al.* (1999) (Page 87 In Proc XII Int. Silage Conf. Swedish Univ. of Agric. Sci. Uppsala, Sweden). Os silos pacotes foram incubados em temperatura ambiente, e após 30 dias, os silos foram aberto, esvaziados e a forragem cuidadosamente misturadas para resultar em uma massa uniforme. Extratos aquosos da silagem de cada silo foram preparados diluindo-se dez (10) gramas em noventa (90) mL de água destilada estéril e agitando-se a mistura em um *stomacher* (Stomacher 400, Seward Limited, London, England) por 1 minuto na configuração média. O pH da silagem foi determinado nesses extratos imediatamente seguindo a preparação dos extratos. As concentrações de matéria seca foram determinadas secando-se um peso constante em um forno de ar forçado a 62 °C. Uma porção da silagem foi secada para peso constante a 62 °C e prensada para passar através de uma tela de 6 mm para determinação *in situ* de DMD e NDFD.

[0075] A silagem prensada (1,5 g), preparada como descrito acima foi pesada em bolsas micro taradas *in situ* (5,5 cm por 5,5 cm; 40 ±15mícrons; Ankom Technology Corp.,

Fairport, N.Y.), as quais foram, então, seladas e re-pesadas como é conhecido na arte. Análise de DMD *in situ* foi conduzida incubando-se o micro em bolsas contendo a silagem nos rumens de três (3) novilhos fistulados através do rúmen os quais haviam sido alimentados e adaptados a uma dieta com silagem de grama por 2 semanas antes da experimentação. Para cada silo, três (3) repetições foram incubadas em cada dos três novilhos fistulados através do rúmen por 48 horas; em conseqüência um total de 27 bolsas foi incubado para cada tratamento. A análise *in situ* foi conduzida pendurando-se sacolas pesadas no rúmen dos novilhos por 48 horas como é conhecido na arte.

[0076] As concentrações de fibras detergentes neutras (NDF) da silagem foram determinadas antes de depois da incubação ruminal de 48 horas usando o Ankom Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, NY). Os coeficientes de digestão de NDF (%) foram calculados como a diferença no peso NDF antes *versus* após a incubação ruminal dividido pelo peso de NDF antes da a incubação ruminal multiplicado por 100.

Tabela 11. Efeitos da inoculação com bactérias de ácido lático produtoras de ferulato esterase no pH e coeficientes de digestibilidade para DM e NDF[1] (DMD e NDFD, respectivamente)em silagem de plantas de centeio e fibras.

Tratamento	pH da Silagem	DMD[2] (% DM)	NDFD[3] (%NDF)
CONTROLE	4,55	61,0	52,5

L. brevis LB1154	4,35	64,8	58,3
L. buchneri LN4017	4,72	61,1	57,5
L. buchneri LN4888	4,87	65,7	57,7
L. reuteri LR4933	4,79	64,5	59,6
L.crispatus LI2127	4,60	63,8	57,3
L.crispatus LI2366	4,53	64,3	57,8
L.crispatus LI2350	4,60	63,9	57,0
Lactobacillus desconhecido UL3050	4,11	63,9	56,6

[1] Os valores expressos são a media de 3 silos por tratamento.

[2] A digestibilidade de matéria seca (DMD), % matéria seca inicial (DM).

[3] Digestibilidade de fibras detergentes neutras (NDFD), % de fibras detergentes neutras iniciais.

[0077] Na colheita, a forragem tinha um pH de 6.,7 e DM (% peso fresco) de 32,9%. Comparado à silagem não-tratada (controle), *L. brevis* linhagem LB1154 e *Lactobacillus* desconhecido linhagem UL3050 resultaram em silagem como um pH menor. Em contraste, *L. buchneri* de linhagens LN4017 e LN4888; *L. reuteri* linhagem LR4933, e *L.crispatus* linhagens LI2350 e LI2127 resultaram em silagem que tinha um pH aumentado.

[0078] *L. buchneri* produtoras de ferulato esterase de linhagens LN4017 e LN4888; *L. reuteri* linhagem LR4933 e *L. brevis* linhagem LB1154 resultaram em silagem como valores de NDFD substancialmente aumentados (Tabela 11), com aumentos entre 5 e 7 unidades (ou 9,5 a 13,3%). A

inoculação com *L.crispatus* produtoras de ferulato esterase de linhagens LI2127 e LI2366 aumentou a NDFD (Tabela 11) em aproximadamente 5 unidades (ou 9,5%); *L.crispatus* linhagem LI2350 e *Lactobacillus* desconhecido linhagem UL3050 aumentaram a NDFD por 4,1 a 4,5 unidades (ou 7,8 a 8,6%).

Exemplo 7 - Efeito da Inoculação com uma Combinação de Bactérias de Ácido lático contendo uma Bactéria de Ácido lático Produtora de Ferulato esterase na Digestibilidade de Nutrientes em carneiros

[0079] Plantas de centeio foram ceifadas com um ceifador/condicionador John Deere e deixadas para murchar até aproximadamente 35% de matéria seca. A forragem foi colhida no dia seguinte usando um cutelo de forragem de duas fileiras John Deere 3950 do tipo de puxar. O comprimento teórico de corte foi de ⅜ a ½ polegadas (0,95 a 1,27 cm). Os tratamentos foram silagem não-tratada (Controle) e a mesma forragem inoculada com uma inóculo de linhagens em combinação consistindo de *L. plantarum* 7109, *L. paracasei tolerans* LC 3200 e *L. buchneri* LN4017 ($2x10^4/2x10^4/1x10^5$ cfu/g de forragem, respectivamente). O tratamento com inóculo foi aplicado como uma solução aquosa e misturado na forragem à medida que a forragem era despejada de uma esteira nos silos. Uma pessoa caminhou no topo de cada silo durante o preenchimento, de forma que os silos foram preenchidos a uma densidade similar. Os silos foram selados com uma camada de plástico; um peso de concreto de 500 libras (226 kg) foi aplicado no topo de cada silo.

[0080] A dieta teste fornecida aos carneiros, 100% silagem de grama, foi fornecida duas vezes ao dia. O estudo de digestão foi conduzido com carneiros com peso médio inicial de aproximadamente 85 libras (38,42 kg). Carneiros divididos por peso foram designados para cada tratamento; a ingestão de dieta foi limitada a 1.2X de manutenção. Seguindo um período de adaptação à dieta de 7 dias, todas as fezes foram coletadas por 5 dias. Amostras de silagem foram obtidas a cada dia. Fezes e urina foram coletadas diariamente e compostas por carneiro para o período de 5 dias.

[0081] Amostras de silagem retiradas periodicamente durante o estudo de alimentação foram testadas para DM, pH, nitrogênio total, fibras detergentes neutras (NDF), e fibras detergentes ácidas (ADF).

[0082] A digestão de NDF (NDFD) (Tabela 13) pelos carneiros foi maior para silagem inoculada com LP7109/LC3200/LN4017 do que para a silagem não-inoculada controle. A inoculação com LP7109/LC3200/LN4017 aumentou as fibras detergentes ácidas (ADF) digestão (ADFD) por 10% de unidades (ou 24%) quando comparado com as silagens controle.

Tabela 13. Efeitos da inoculação com uma combinação de linhagens contendo bactérias de ácido lático produtoras de ferulato esterase na Digestão de silagem de grama em carneiros

Item	Controle	LP7109/LC3200/ LN4017
Número de animais	11	12
Peso do animal, libras	82,5	84,4
Ingestão de matéria seca, g/d	700,1	703,7
Análise da dieta[1]	% DM	
Matéria seca	30,91	38,03
Nitrogênio total	2,33	2,04
NDF	57,35	61,72
ADF	38,41	41,32
Digestibilidade, %[2]		
Matéria seca	57,03	59,86
Nitrogênio	65,74	65,86
NDF	55,99	61,37
ADF	44,05	54,75

[1]Valores usados para calcular a digestibilidade. Os valores são expressos como a media de cinco amostras replicadas.

[2]Valores são expressos como médias *least squares*.

[0083] Tendo ilustrado e descrito os princípios das incorporações da presente invenção, deveria estar aparente a pessoas especialistas na arte que as incorporações da invenção podem ser modificadas em arranjo e detalhe sem abandonar tais princípios. Nós reivindicamos todas as

modificações que estão dentro do espírito e escopo das reivindicações em seguida.

[0084] Todas publicações e documentos de patente publicados citados nessa especificação são aqui incorporados por referência à mesma extensão como se cada publicação ou documentos de patente publicados individuais estivessem especificamente e individualmente indicados para serem aqui incorporados como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de material vegetal pré-ensilado, para intensificar a digestibilidade da silagem resultante, caracterizado pelo fato de que compreende: adicionar ao dito material vegetal pré-ensilado uma quantidade intensificadora de digestibilidade da composição compreendendo uma linhagem de *Lactobacillus* produtora de ferulato esterase e um veículo adequado, em que a linhagem de *Lactobacillus* é selecionada a partir de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Patent Deposit No. PTA-6138, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30866 e misturas destas.

2. Método de tratamento de material vegetal pré-ensilado, caracterizado pelo fato de que compreende adicionar a este uma linhagem bacteriana selecionada a partir de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Patent Deposit No. PTA-6138, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30866 e misturas destas.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material vegetal pré-ensilado é selecionado do grupo consistindo em gramíneas, milho, alfafa, trigo, legumes, sorgo, girassol, cevada e misturas destes.

4. Método para intensificar a digestão de fibras vegetais em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende alimentar um dito animal com uma quantidade eficaz de uma composição

contendo ferulato esterase, em que a dita ferulato esterase é derivada de uma linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase selecionada do grupo consistindo em *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Patent Deposit No. PTA-6138, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30866 e misturas destas.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a composição fornecida como alimento foi tratada com uma quantidade catalítica efetiva da linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase.

6. Composição para o uso como um inóculo de silagem, caracterizada pelo fato de que compreende: uma quantidade intensificadora de digestibilidade de silagem de *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200, depositada como Patent Deposit No. PTA-6135, uma linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase selecionada a partir de *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4017, depositada como Patent Deposit No. PTA-6138, *Lactobacillus buchneri*, linhagem LN4888, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30866 e misturas destas, e um veículo adequado.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que compreende ainda *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP678, depositada como Patent Deposit No. PTA-6134, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3710, depositada como Patent Deposit No. PTA-6136, *Lactobacillus plantarum*, linhagem LP3779, depositada como Patent Deposit No. PTA-6137,

Lactobacillus plantarum, linhagem LP7109, depositada como Patent Deposit No. PTA-6139, *Lactobacillus brevis*, linhagem LB1154, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30865, *Lactobacillus reuteri*, linhagem LR4933, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30867, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2127, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30868, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2350, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30869, *Lactobacillus crispatus*, linhagem LI2366, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30870, *Lactobacillus* de espécie desconhecida, linhagem UL3050, depositada como Patent Deposit No. NRRL B-30871, ou misturas destas.

8. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que contém entre cerca de 10^1 a cerca de 10^{10} de organismos viáveis de ditos *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^1 a cerca de 10^{10} de organismos viáveis de dita linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase por grama de material vegetal pré-ensilado.

9. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que contém entre cerca de 10^2 a cerca de 10^7 de organismos viáveis de ditos *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^2 a cerca de 10^7 de organismos viáveis de dita linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase por grama de material vegetal pré-ensilado.

10. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que contém entre cerca de 10^3 a cerca de 10^6 de organismos viáveis de ditos *Lactobacillus paracasei tolerans*, linhagem LC3200 por grama de material vegetal pré-ensilado e entre cerca de 10^3 a cerca de 10^6 de organismos viáveis de dita linhagem bacteriana produtora de ferulato esterase por grama de material vegetal pré-ensilado.