

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 175**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23K 30/15** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61K 35/747** (2015.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2017 PCT/JP2017/009185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17159483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2017 E 17766484 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022 EP 3431580**

54 Título: **Bacterias ácido lácticas para la preparación de ensilaje y aditivo para la preparación de ensilaje**

30 Prioridad:

**15.03.2016 JP 2016050808**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.05.2022**

73 Titular/es:

**SNOW BRAND SEED CO., LTD. (100.0%)  
5-1-8 Kaminopporo 1-jo, Atsubetsu-ku, Sapporo-shi  
Hokkaido 004-8531, JP**

72 Inventor/es:

**HONMA, MITSURU y  
KITAMURA, TORU**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 911 175 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Bacterias ácido lácticas para la preparación de ensilaje y aditivo para la preparación de ensilaje

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una bacteria ácido láctica para la preparación de ensilaje, un aditivo para preparar piensos o aditivo para preparar ensilaje que usa dicha bacteria ácido láctica y un método para preparar ensilaje usando dicho aditivo.

**Antecedentes de la técnica**

10 El ensilaje es un alimento importante y un alimento básico principal para las vacas, y la calidad del ensilaje tiene una influencia significativa en las operaciones de producción lechera. El ensilaje se refiere a una técnica de fermentación de pasto crudo y otros cultivos forrajeros para su conservación a largo plazo. Sin embargo, durante mucho tiempo se han analizado dos problemas con respecto a la producción de ensilaje. Uno es la fermentación del ácido butírico causada por bacterias del ácido butírico durante la conservación hermética, que debe inhibirse. La otra es la fermentación secundaria del ensilaje causada por el calentamiento y el consiguiente deterioro de cantidades crecientes de levadura, etc., después de la apertura, que también debe inhibirse. Para resolver estos dos problemas, los aditivos de ensilaje se han examinado desde hace mucho tiempo; sin embargo, todavía no se dispone de ningún aditivo de ensilaje que pueda resolver ambos problemas. En particular, el problema de la fermentación secundaria se está volviendo más grave a medida que se generaliza el uso de piensos de TMR.

20 Se han realizado propuestas para abordar estos problemas. Una propuesta importante es añadir una bacteria ácido láctica, que es muy capaz de producir ácido láctico en ensilaje, cuando el ensilaje se prepara de modo que el ácido láctico favorezca un descenso del valor de pH del ensilaje, inhibiendo de este modo el crecimiento de microorganismos perjudiciales. La referencia de patente 1 describe que un descenso de la calidad del ensilaje debido a microorganismos perjudiciales se puede prevenir usando, como bacteria ácido láctica de ensilaje, la bacteria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* cepa Chikuso-1 (PERM P-18930) que tiene una excelente resistencia al ácido y capacidad de fermentación del ácido láctico o la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* cepa RO50 (FER.M P-18931) que tiene acción antibacteriana contra bacterias aeróbicas y bacterias del ácido butírico. Sin embargo, no se menciona la capacidad de la invención en la referencia de patente 1 para inhibir la fermentación secundaria y se desconoce su efecto a este respecto.

30 La referencia de patente 2 describe el uso, como bacteria ácido láctica de ensilaje, la bacteria ácido láctica *Enterococcus faecium* cepa NAS62 (N1TE P-781) que produce bacteriocinas, para inhibir microorganismos perjudiciales mediante la acción antibacteriana de las bacteriocinas. La referencia de patente 2 describe que no se detectan bacterias filamentosas en el ensilaje y que no se detectan bacterias filamentosas en piensos TMR fermentados, tampoco.

40 La referencia de patente 3 propone un aditivo para preparar ensilaje que contiene una bacteria ácido láctica homofermentativa capaz de producir reuterina que tiene acción antimicótica, así como glicerol y vitamina B12. La reuterina es una sustancia antibacteriana producida por *Lactobacillus reuteri*, en un ambiente anaeróbico, en un medio de cultivo que contiene glicerina.  $\beta$ -hidroxipropionaldehído, que es un producto de fermentación de la glicerina, se detecta en el sobrenadante de este cultivo, y este  $\beta$ -hidroxipropionaldehído, que supuestamente está presente en soluciones acuosas en forma de monómero, hidrato o dímero, se denomina "reuterina". La reuterina presenta propiedades antibacterianas contra bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, levaduras y hongos. Sin embargo, la producción de reuterina no es muy práctica en aplicaciones reales de preparación de ensilaje porque requiere una gran cantidad de glicerol. La referencia de patente 4 desvela una composición para la producción de ensilaje que usa *Lactococcus lactis* capaz de producir nicina, que es una sustancia antibacteriana, así como una bacteria ácido láctica resistente a los ácidos lácticos.

50 La referencia de patente 5 describe que, cuando se añadió al ensilaje *Lactobacillus diolivorans* separado del ensilaje, el ensilaje no experimentó una fermentación anómala.

55 Como se ha descrito anteriormente, se proponen diversos tipos de bacterias ácido lácticas para la preparación de ensilaje y de aditivos para la fabricación de ensilaje usando estas bacterias ácido lácticas; sin embargo, la realidad es que ninguno de ellos es exactamente satisfactorio. En particular, el problema de la fermentación secundaria del ensilaje presenta un gran desafío.

60 Dicho de manera sencilla, el problema de la fermentación secundaria del ensilaje se refiere a un deterioro aeróbico que se produce después de que el ensilaje se extraiga de un silo o rollo de envoltura. Ninguna de las bacterias ácido lácticas de ensilaje propuestas por la técnica anterior ha podido solucionar completamente este problema. En un silo sellado o en un rollo de envoltura, el ensilaje está en un ambiente de pH bajo constante, lleno de gas de ácido carbónico, gas de nitrógeno, etc., y es estable. Las diversas bacterias que se habían adherido al material y entraron

en el silo o el rollo junto con el material cuando se cargó, están inactivas en esta condición. Una vez que el silo se abre o el rollo se rompe y el ensilaje se expone al aire, sin embargo, los microorganismos que se activan en presencia de aire, o microorganismos específicamente aerobios, crecen rápidamente. En particular, las levaduras se activan rápidamente con la humedad, temperatura y nutrición adecuadas (las levaduras toman el ácido láctico, etc., producidos en el ensilaje como nutrientes) y la temperatura del ensilaje aumenta rápidamente. Estimulados por este calor, los hongos comienzan a crecer y, en consecuencia, el ensilaje no solo se vuelve marrón y desprende un olor fétido, sino que también se vuelve menos apetitoso y digerible para las vacas, provoca pérdida de materia seca del ensilaje, provoca diarrea en las vacas lecheras, conduce a la producción de leche de inseguridad alcohólica o similares, lo que da lugar a una pérdida monetaria significativa.

## Bibliografía de antecedentes de la técnica

### Bibliografía de patentes

Referencia de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2004-041064  
 Referencia de patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2011-41474  
 Referencia de patente 3: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2008-35728  
 Referencia de patente 4: Patente internacional abierta a inspección pública n.º 2013/001862  
 Referencia de patente 5: Patente de los Estados Unidos abierta a inspección pública n.º 2005/0281917

## Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

## Problemas que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una bacteria ácido láctica que inhiba la fermentación secundaria del ensilaje y, por tanto, resulte útil en la preparación ideal de ensilaje. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para fabricar ensilaje cuya fermentación secundaria esté inhibida.

## Medios para resolver los problemas

Después de una gran cantidad de investigación y repetidas exploraciones de bacterias ácido lácticas para preparar ensilaje y piensos para lograr los objetivos anteriormente mencionados, los inventores de la presente invención identificaron un grupo de *Lactobacillus diolivorans* que tienen acción antilevadura, de entre los *Lactobacillus diolivorans* que hasta ahora no llamaban la atención como bacterias ácido lácticas para preparar ensilaje. Se confirmó que los *Lactobacillus diolivorans* de este grupo tienen alta capacidad de producción de ácido láctico y ácido acético, para mejorar la calidad del ensilaje. Los objetivos anteriormente mencionados se lograron utilizando este grupo de *Lactobacillus diolivorans*.

La presente invención abarca los siguientes constituyentes.

(1) Una bacteria ácido láctica para preparar ensilaje, constituida por un *Lactobacillus diolivorans* que tiene acción antilevadura, en donde el *Lactobacillus diolivorans* es la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0006 (NITE BP-02208), la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0007 (NITE BP-02209) o la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0009 (NITE BP-02210).

(2) Ensilaje que contiene la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans* según (1).

(3) Un aditivo para preparar ensilaje, que comprende la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans* según (1).

(4) Un método para preparar ensilaje, caracterizado por que se añade al material de ensilaje un aditivo para la preparación de ensilaje según (3).

## Efectos de la invención

La presente invención puede proporcionar un *Lactobacillus diolivorans*, que es una bacteria ácido láctica que tiene acción antilevadura, así como, en condiciones reales de fermentación de ensilaje, acción para inhibir levaduras y otros hongos y características, para producir una sustancia antifúngica en una solución de cultivo de la bacteria ácido láctica. Esta bacteria ácido láctica puede proporcionar un aditivo de ensilaje que ofrece una excelente resistencia a los ácidos y puede lograr una fermentación del ácido láctico de calidad. La fermentación secundaria se inhibe en el ensilaje obtenido. Esto significa que, cuando la presente invención se aplica a piensos TMR, etc., se espera que los piensos emitan menos olor a descomposición o deterioro, sean muy seguros para el ganado y lo consuman más, y aumenten el peso del ganado de engorde y la cantidad de leche producida por las vacas lecheras, entre otros.

**Breve descripción de los dibujos**

[FIG. 1] Un gráfico que muestra que las células bacterianas trituradas de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans* propuesta por la presente invención inhiben el crecimiento de la levadura *Pichia fermentans*.

[FIG. 2] Un gráfico que muestra que las células bacterianas trituradas de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans* propuesta por la presente invención inhiben el crecimiento de la levadura *Issatchenkia orientalis*.

[FIG. 3] Resultados de una prueba de exploración de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans*, donde la inhibición del crecimiento de la levadura *Pichia fermentans* es un indicador.

[FIG. 4] Resultados de una prueba de exploración de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans*, donde la inhibición del crecimiento de la levadura *Issatchenkia orientalis* es un indicador.

[FIG. 5] Un gráfico de dispersión que muestra los resultados de las pruebas de exploración mostradas en las FIGS. 3 y 4. Este gráfico se usa para evaluar los efectos antilevadura contra las dos levaduras de un vistazo.

[FIG. 6] Un gráfico que muestra las cualidades de fermentación de las muestras de ensilaje fermentadas a 25 °C después de añadir las bacterias ácido lácticas para ensilaje en los ejemplos 1 a 4 y el ejemplo comparativo.

[FIG. 7] Un gráfico que muestra las cualidades de fermentación de las muestras de ensilaje fermentadas a 15 °C después de añadir las bacterias ácido lácticas para ensilaje en los ejemplos 1 a 4 y el ejemplo comparativo.

[FIG. 8] Un gráfico que muestra los tiempos que tardan las muestras de ensilaje preparadas mediante la adición de las bacterias ácido lácticas para ensilaje en los ejemplos 1 a 4 y el ejemplo comparativo, en alcanzar los 30 °C después de la apertura.

[FIG. 9] Un gráfico que muestra los tiempos que tardan las muestras de ensilaje preparadas mediante la adición de las bacterias ácido lácticas para ensilaje en los ejemplos 1 a 3 y los ejemplos comparativos 1 y 2 y después almacenadas en una condición de 15 °C, en alcanzar los 30 °C después de la apertura.

**Modo para llevar a cabo la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a una nueva bacteria ácido láctica, *Lactobacillus diolivorans*, que tiene acción antilevadura.

Además, la presente invención se refiere a un aditivo para la preparación de piensos que contiene la bacteria ácido láctica anteriormente mencionada, un pienso tal como ensilaje caracterizado por contener una cepa de la bacteria y un método para prepararlo.

La presente invención se explica en detalle a continuación.

La bacteria ácido láctica *Lactobacillus diolivorans* propuesta por la presente invención es una bacteria ácido láctica que experimente heterofermentación. Puede obtenerse seleccionando esta bacteria ácido láctica a medida que se separa del ensilaje.

Normalmente, de entre las cepas bacterianas del ácido láctico separadas del ensilaje, las cepas clasificadas como *Lactobacillus diolivorans* se mezclan con trozos de maíz dentado u otro material vegetal usado para preparar ensilaje, así como una solución de cultivo de una levadura separada del ensilaje, y la mezcla se coloca en bolsas de polietileno y después se almacena durante dos meses a 25 °C, después de lo cual se abren las bolsas y el contenido de ácido orgánico, el recuento de células de levadura, el recuento de células de las bacterias ácido lácticas y el tiempo hasta alcanzar los 30 °C después de la apertura (tiempo de fermentación secundaria) se usan como indicadores para realizar un cribado primario.

A continuación, los *Lactobacillus diolivorans* que presenten un contenido de ácido orgánico, recuento de células de levadura, recuento de células de bacterias ácido lácticas y tiempo hasta alcanzar los 30 °C después de la apertura (tiempo de fermentación secundaria) favorables para el ensilaje, se cultivan usando el medio de cultivo MRS o el medio de cultivo GYP, después de lo cual las células bacterianas se recogen y a continuación se rompen en fragmentos, y estas bacterias fragmentadas se seleccionan después de confirmar su acción antilevadura (acción para inhibir el crecimiento de levadura) usando el crecimiento de la levadura *Pichia membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis* o *Pichia fermentans* separada del ensilaje, como indicador.

Entre los *Lactobacillus diolivorans* antilevadura que tienen las características anteriormente mencionadas, se prefieren los que presenten una alta producción de ácido láctico, así como acción de fermentación del ensilaje de características de calidad favorables, además de la acción antilevadura.

5 La invención proporciona la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0006 (NITE BP-02208), la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0007 (NITE BP-02209) y la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0009 (NITE BP-02210), que fueron separadas por los inventores de la presente invención y se depositaron internacionalmente en el Depositario de Microorganismos de Patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NPMD) (centro 122, 2-5-8 Kazusakamatori, Kisarazu-shi, Chiba-ken, Japón (código postal 292-0818)) a partir del 22 de febrero de 2016.

10 Las bacterias ácido lácticas anteriores se pueden cultivar usando un medio de cultivo convencional para bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo no está limitado de ninguna manera y se puede usar cualquier medio de cultivo usado para cultivar bacterias ácido lácticas. Por ejemplo, se puede usar el medio de cultivo GYP o el medio de cultivo MRS. Aunque las condiciones de cultivo no están limitadas de ninguna manera, normalmente, el cultivo se realiza a un pH de 5,0 a 7,0 y de 25 a 40 °C durante 10 a 48 horas. Las bacterias ácido lácticas cultivadas, que pueden estar en estado de solución de cultivo o solución concentrada en la que las células bacterianas están concentradas, se pueden añadir al material para preparar ensilaje, o al ensilaje fermentado, TMR u otros piensos fermentados. Estas soluciones se pueden usar congeladas. Además, las bacterias ácido lácticas cultivadas pueden liofilizarse, secarse por pulverización o secarse por lecho fluido, junto con un agente protector apropiado y un material de base, en polvo y usarse como aditivo para la preparación de ensilaje. Si fuera necesario, se puede añadir trehalosa, polvo de carbonato de calcio, etc., al polvo de bacterias ácido lácticas liofilizado. Además, cualquier componente conocido, tal como celulosa, se puede añadir para promover la fermentación del ensilaje.

25 El aditivo para preparar ensilaje propuesto por la presente invención se puede usar para preparar diversos tipos de ensilaje y piensos fermentados. El material usado para preparar ensilaje o piensos fermentados no está limitado de ninguna manera y se puede usar cualquier material normalmente usado como pienso, donde los ejemplos incluyen pastos y cultivos forrajeros tales como alfalfa, trébol, fleo de los prados, dáctilo, alpiste arundináceo, grama del Norte, raigrás italiano, raigrás inglés, festuca cañosa, festuca de los prados, *Festulolium*, poa de los prados, agróstide blanca, pasto de Guinea, pasto rosado, pasto napier, avena, cebada, centeno, sorgo, pasto del Sudán, mijo, maíz, arroz forrajero, así como granos blandos que comprenden principalmente granos de maíz y arroz. Entre los subproductos de la producción de alimentos, los ejemplos incluyen lías de cerveza, lías de cerveza baja en malta, lías de tofu, lías de té, lías de sochu, lías de whisky, pulpa de remolacha, bagazo, lías de café, lías de zumo, lías de berza, lías de almidón, etc. Entre los subproductos agrícolas, los ejemplos incluyen paja de arroz, paja, verduras fuera de las especificaciones, etc. Además, la presente invención se puede añadir a la TMR fermentada preparada mezclando subproductos de la producción de alimentos, ensilaje, subproductos agrícolas, heno, piensos concentrados, formulaciones de vitaminas/minerales, etc. Idealmente, estos materiales de pienso fermentados y de ensilaje se usan ajustando el contenido de humedad en un intervalo de 40 a 90 por ciento en masa.

40 En cuanto a la cantidad de uso de un aditivo para preparar ensilaje, la cantidad de células bacterianas que se añadirán se ajusta de modo que el recuento total de células se convierta en  $10^3$  a  $10^7$ , o preferentemente  $10^4$  a  $10^6$ , por 1 gramo de material. Según la presente invención, el aditivo no está limitado de ninguna manera y se puede usar cualquier pasto o cultivo forrajero usado para ensilaje o pienso fermentado, donde los ejemplos incluyen alfalfa, trébol, fleo de los prados, dáctilo, alpiste arundináceo, grama del Norte, raigrás italiano, raigrás inglés, festuca cañosa, festuca de los prados, *Festulolium*, poa de los prados, agróstide blanca, pasto de Guinea, pasto rosado, pasto napier y otros pastos, así como maíz, sorgo y otros cultivos forrajeros. De forma ideal, se usa maíz o sorgo que experimenta fácilmente una fermentación secundaria. En cuanto a la forma de pastos y cultivos forrajeros, el pasto recién cortado se puede usar directamente o se puede refrigerar o congelar y después conservar antes de su uso, o se puede triturar y usar como polvo seco pasto secado al aire o liofilizado. Además, se pueden usar piensos disponibles en el mercado, tales como gránulos de alfalfa y cubos de heno, o se pueden usar granos blandos que comprenden principalmente granos de maíz y arroz.

55 El ensilaje y los piensos fermentados se fermentan en condiciones anaeróbicas. El recipiente de fermentación no está limitado de ninguna manera y se puede usar cualquier recipiente capaz de mantener un estado anaeróbico en cierta medida, donde los ejemplos incluyen un silo de tipo búnker, silo de pila, silo de zanja, silo de torre, silo subterráneo, silo de bloque, silo de taza, paca circular, bolsa contenedora flexible, etc. El ensilaje se puede obtener dejando el material en reposo durante una semana a dos meses a una temperatura exterior de normalmente 5 a 30 °C, o preferentemente de 15 a 25 °C, para la fermentación.

60 El ensilaje y los piensos fermentados obtenidos mediante el uso del aditivo para la preparación del ensilaje propuesto por la presente invención no experimentan fermentación secundaria después de su apertura, por lo que son preferidos y consumidos en volúmenes favorables por las vacas, y sus valores nutricionales no disminuyen.

**Ejemplos**

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación citando ejemplos y ejemplos comparativos. Resulta evidente que las siguientes descripciones se proporcionan para explicar la presente invención y no limitan la presente invención a estos ejemplos.

5 <1. Exploración primaria de *Lactobacillus diolivorans*>

10 Se usaron dieciocho cepas de bacterias ácido lácticas que se habían separado del ensilaje y que Snow Brand Seed Co. LTD. había confirmado que eran *Lactobacillus diolivorans*. Los nombres de las cepas dadas por Snow Brand Seed Co., LTD. son las siguientes: 3, 66, 126, 128, 183, 187, 379, 518, 547, 574, 586, 602, 603, 617, 707, 746, 767 y Oda 2.

## (1) Preparación de ensilaje

15 Las 18 cepas se cultivaron en el medio de cultivo líquido GYP y se prepararon y liofilizaron  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml de líquido de cultivo, para obtener bacterias ácido lácticas en polvo. Se realizó una prueba de exploración primaria con estos polvos.

20 En la prueba de exploración primaria, se añadieron 3 ml de un líquido de cultivo de levadura ( $7,0 \times 10^8$  UFC/ml) separado del ensilaje existente a 300 g de trozos de maíz dentado cosechado en el otoño y después se congelaron y se conservaron como material de ensilaje, después de lo cual se añadió 1 ml de una solución preparada suspendiendo 30 mg de cada uno de los polvos de bacterias ácido lácticas en 100 ml de agua de intercambio iónico mediante pulverización (por un equivalente de 1 mg/kg) y los ingredientes se mezclaron, se pesaron y se separaron en unidades de 100 g, que después se sellaron individualmente en bolsas de polietileno (repetidas tres veces). Las bolsas selladas se conservaron durante dos meses en condiciones de preparación de ensilaje de 25 °C.

## 25 (2) Calidad del ensilaje

30 Después del periodo prescrito, las bolsas se abrieron para retirar el ensilaje para medir el pH, el contenido de ácido orgánico (por HPLC), el recuento de células de bacterias ácido lácticas y el recuento de células de levadura. Además, el aumento de la temperatura del ensilaje después de la apertura se midió a una temperatura ambiente de 25 °C, para medir cuánto tiempo tardó en alcanzar los 30 °C, un indicador de fermentación secundaria del ensilaje. Los resultados medidos se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Cepa bacteriana probada	pH	Contenido de ácidos orgánicos (%)					Levadura (log ufc/g)	Bacterias del ácido láctico (log ufc/g)	Tiempo hasta alcanzar los 30 °C
		Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico				
Sin adición de bacterias del ácido láctico	4,22	0,77	1,64	0	0	0	5,78	8,38	13
3	4,35	0,15	2,08	0,03	0	0	5,51	9,22	19
66	4,33	0,05	2,23	0,06	0	0	5,33	9,25	21
126	4,33	0,06	2,14	0,07	0	0	5,52	9,12	21
128	4,32	0,04	2,27	0,11	0	0	5,53	9,11	19
183	4,34	0	2,24	0,08	0	0	5,66	8,89	23
187	4,33	0,01	2,31	0,08	0	0	5,47	9,23	19
379	4,3	0,1	2,22	0,06	0	0	5,2	9,22	18
518	4,31	0,16	2,17	0,04	0	0	5,31	9,06	19
547	4,31	0,01	2,37	0,07	0	0	5,74	9,19	19
574	4,32	0,11	2,26	0,06	0	0	4,89	8,59	17
586	4,31	0	2,57	0,05	0	0	6,03	9,2	19
602	4,33	0,04	2,45	0,08	0	0	5,2	9,14	18
603	4,35	0	2,56	0,08	0	0	5,73	9,13	18
617	4,34	0,12	2,25	0,05	0	0	5,38	9,08	17
707	4,33	0,06	2,31	0,06	0	0	5,62	9,11	19
746	4,33	0,01	2,39	0,09	0	0	5,08	9,09	19
767	4,31	0,02	2,46	0,09	0	0	4,9	9,14	21
Oda 2	4,34	0	2,56	0,07	0	0	5,65	8,35	20

Como se muestra en la tabla 1, se confirmó que las 18 cepas probadas de *Lactobacillus diolivorans* eran cepas favorables que producían ácido acético/ácido propiónico, pero no producían ácido butírico, en el ensilaje. Sin embargo, estas muestras de ensilaje hechas de maíz dentado congelado y conservado contenían principalmente ácido acético y su fermentación secundaria no pudo evitarse mediante la inhibición de levadura.

5

#### <2. Exploración secundaria de *Lactobacillus diolivorans*>

10

El ensilaje de maíz dentado se preparó usando las 18 cepas de *Lactobacillus diolivorans* usadas en la exploración primaria y se realizó una exploración secundaria en función del tiempo hasta alcanzar los 30 °C debido a la fermentación secundaria después de la apertura, como indicador.

##### (1) Preparación de ensilaje

15

El maíz dentado (en la etapa amarilla madura) se cosechó y se cortó en trozos pequeños con una trituradora, después de lo cual cada uno de los polvos de bacterias ácido lácticas se añadió a 1 mg por 1 kg de maíz dentado y se mezcló bien, al igual que en la exploración primaria, y se cargaron 800 g de la mezcla y se sellaron en frascos de 1 l como ensilaje. El ensilaje se almacenó a una temperatura de 25 °C y se fermentó durante 10 semanas.

20

##### (2) Exploración de cepas bacterianas según el cambio de la calidad del ensilaje

25

Después del periodo prescrito, los frascos se abrieron para retirar el ensilaje para medir el cambio de la temperatura del ensilaje después de la apertura, para medir cuánto tiempo tardó en alcanzar los 30 °C, un indicador de fermentación secundaria del ensilaje, para seleccionar cepas bacterianas que inhibieran la fermentación secundaria. Como resultado, se confirmó que las dos cepas de 603 y 767, en particular, impidieron que la temperatura del ensilaje aumentara durante mucho tiempo (100 horas o más) después de la apertura. Además, se confirmó que el crecimiento de levadura estaba inhibido en el ensilaje preparado con las cepas 603 y 767.

#### <3. Separación de la cepa 767S y la cepa 767R de la cepa 767>

30

Cuando la cepa 767 se subcultivó en el medio de placa MRS, se separó en un clon que tenía una forma de colonia suave y un clon que tenía una periferia de colonia rugosa. El primero se denominó "767S", y el último se denominó "767R".

35

Las pruebas que se explican a continuación se realizaron en las tres cepas de 767S, 767R y 603.

#### <4. Prueba de inhibición del crecimiento de levadura>

40

Las cepas 767S, 767R y 603 inhiben el crecimiento de levadura en ensilaje y en sistemas de cultivo de levadura pura, las bacterias trituradas de las cepas 767S, 767R y 603 inhiben la proliferación. Esto se explica citando ejemplos representativos.

##### (1) Método de prueba

45

##### 1) Preparación de solución de células de bacterias ácido lácticas trituradas

50

Se mezclaron un medio de cultivo líquido MRS (Difco) y un medio de cultivo de caldo de maíz al 10 % en polvo en una relación de 1:1. Las bacterias ácido lácticas se inocularon en el medio mixto y se cultivaron durante cinco días a 37 °C. A continuación, se distribuyeron 10 ml de la solución de cultivo en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y los sedimentos se lavaron dos veces con PBS (-). Los sedimentos lavados se centrifugaron de nuevo a 3500 rpm durante 15 minutos y los sedimentos se suspendieron en 1 ml de PBS (-). Se colocó un tubo Falcon de 50 ml que contenía agua en una bandeja llena de hielo, y se colocó en él el tubo Falcon de 15 ml, y, en estas condiciones, las células se trituraron durante 5 minutos usando un desintegrador ultrasónico. Después de centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se esterilizó, para obtener una solución de células bacterianas trituradas. Este líquido de extracción de bacterias ácido lácticas se usó para la prueba. Cabe destacar que las bacterias ácido lácticas en las que se realizó esta prueba, eran las que se sabe que inhiben el crecimiento de levaduras en el ensilaje, a saber, *Lactobacillus paracasei* 2347, *Lactobacillus buchneri* NK01 y *Lactococcus lactis* TJ48 (SBS0001), así como las cepas 767S y 767R separadas anteriormente.

60

##### 2) Prueba de inhibición del crecimiento de levadura

65

En una microplaca de 96 pocillos, se distribuyeron 180 µl de base nitrogenada de levadura (Difco) ajustada a pH 4,0, 10 µl de fuente de carbono 100 mM y 10 µl de cada solución de células de bacterias ácido lácticas de prueba trituradas y después se añadieron 2 µl de cada levadura lavados con PBS (-) (solución de cultivo obtenida cultivando la levadura a 27 °C durante 48 horas en el medio de cultivo YPD (levaduras: se añadió *Pichia fermentans* (en lo sucesivo en el

presente documento denominada "Pf") e *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*, en lo sucesivo en el presente documento denominada "Ck"). La fuente de carbono fue ácido láctico para Pf y ácido acético para Ck. Cabe destacar que las dos levaduras usadas habían sido separadas del ensilaje, e identificadas, por los inventores de la presente invención.

5

La solución de cultivo se cultivó de forma aeróbica a 27 °C durante 48 horas y después se agitó por pipeteo, después de lo cual se evaluó la acción de inhibición del crecimiento de la levadura en función de la medición de D.O. a 600 nm.

## (2) Resultados

10

Los resultados de la prueba de inhibición del crecimiento con respecto a la levadura Pf se muestran en la FIG. 1, mientras que los resultados de la prueba de inhibición del crecimiento con respecto a la levadura Ck se muestran en la FIG. 2.

15

Claramente, se confirmó que las soluciones de células bacterianas trituradas de las cepas 767S y 767R inhiben el crecimiento de levaduras en comparación con las de otras bacterias ácido lácticas. Se determinó que esta prueba es útil para la exploración de la acción antilevadura.

20

Además, cuando se realizó la misma prueba en las cepas 603 y 547 exploradas en función de su capacidad para inhibir el aumento de la temperatura del ensilaje, también se confirmó que las soluciones de células bacterianas trituradas de las cepas 603 y 547 inhiben notablemente el crecimiento de levadura. Supuestamente, esta acción inhibidora de la levadura es atribuible a la producción de una sustancia que presenta algún tipo de acción antilevadura en las células de las bacterias ácido lácticas.

25

No se conocen *Lactobacillus diolivorans* que produzcan tal sustancia con acción antilevadura.

Los resultados de las pruebas anteriores confirman que los *Lactobacillus diolivorans* separados del ensilaje y explorados por los inventores de la presente invención representan un nuevo grupo de microorganismos que tienen una buena capacidad de fermentación del ensilaje así como una acción antilevadura.

30

Cabe destacar que las cepas 767S, 767R y 603 han sido depositadas internacionalmente por los solicitantes de la presente invención en el Depositario de Microorganismos de Patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación como la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0006 (NITE BP-02208), la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0007 (NITE BP-02209) y la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0009 (NITE BP-02210), respectivamente.

35

### <5. Propiedades bacterianas de las cepas 603, 547, 767S y 767R>

Las cuatro cepas de 603, 547, 767S y 767R anteriores se clasifican como *Lactobacillus diolivorans*. Estas cuatro cepas se examinaron más a fondo para determinar sus propiedades bacterianas (propiedades de asimilación de azúcar) según el Manual de Bergey. Sus propiedades de asimilación después de 48 horas de cultivo fueron diferentes de las presentadas después de 5 días de cultivo. La tabla 2 a continuación muestra las propiedades de asimilación después de 48 horas de cultivo, mientras que la tabla 3 muestra las propiedades de asimilación después de 5 días de cultivo.

40

Cabe destacar que la tabla 2 también enumera las propiedades de asimilación de azúcar de la cepa JCM12183 (proporcionada por RIKEN BioResource Center), que es una cepa convencional de *Lactobacillus diolivorans* cuya información está disponible para el público, para comparación.

45

[Tabla 2]

48 h	Referencia JCM12183	N.º 547	N.º 603	767S	767R	
Control	-	-	-	-	-	Control
Glicerol	-	-	-	-	-	Glicerol
Eritritol	-	-	-	-	-	Eritritol
D-Arabinosa	-	-	w	w	w	D-Arabinosa
L-Arabinosa	+	+	+	+	+	L-Arabinosa
D-Ribosa	+	+	+	+	+	D-Ribosa
D-Xilosa	+	+	+	+	+	D-Xilosa
L-Xilosa	-	-	w	-	-	L-Xilosa
D-Adonitol	-	-	-	-	-	D-Adonitol
Metil-BD-Xilopiranosido	+	+	w	w	+	Metil-BD-Xilopiranosido
D-Galactosa	+	-	-	+	+	D-Galactosa
D-Glucosa	+	-	-	+	+	D-Glucosa
D-Fructosa	+	w	w	+	+	D-Fructosa
D-Manosa	-	-	-	w	w	D-Manosa
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	L-Sorbosa
L-Ramnosa	-	-	-	-	-	L-Ramnosa
D-Dulcitol	-	-	-	-	-	D-Dulcitol
Inositol	-	-	-	-	-	Inositol
D-Manitol	-	-	-	w	w	D-Manitol
D-Sorbitol	-	-	-	w	w	D-Sorbitol
Metil-AD-Manopiranosido	-	-	-	-	-	Metil-AD-Manopiranosido
Metil-AD-Glucopiranosido	+	-	-	w	w	Metil-AD-Glucopiranosido
N-Acetil glucosamina	-	-	-	-	-	N-Acetil glucosamina
Amigdalina	-	-	-	-	-	Amigdalina
Arbutina	-	-	-	-	-	Arbutina
Citrato férrico de esculina	-	-	-	-	-	Citrato férrico de esculina
Salicina	-	-	-	-	-	Salicina
D-Celobiosa	-	-	-	-	-	D-Celobiosa
D-Maltosa	+	-	-	w	+	D-Maltosa
D-Lactosa	-	-	-	w	w	D-Lactosa
D-Melibiosa	+	-	-	+	+	D-Melibiosa
D-Sacarosa	-	-	-	-	-	D-Sacarosa
D-Trehalosa	-	-	-	-	-	D-Trehalosa
Inulina	-	-	-	-	-	Inulina
D-Melecitosa	-	-	-	-	-	D-Melecitosa
D-Rafinosa	w	-	-	w	w	D-Rafinosa
Almidón	-	-	-	-	-	Almidón
Glucógeno	-	-	-	-	-	Glucógeno
Xilitol	-	-	-	w	w	Xilitol
Gentiobiosa	-	-	-	-	-	Gentiobiosa
D-Turanosa	-	-	-	-	-	D-Turanosa
D-Lixosa	-	-	-	-	-	D-Lixosa
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	D-Tagatosa
D-Fucosa	-	-	-	-	-	D-Fucosa
L-Fucosa	-	-	-	-	-	L-Fucosa
D-Arabitol	+	-	-	+	+	D-Arabitol
L-Arabitol	-	-	-	-	-	L-Arabitol
Gluconato	+	-	-	w	w	Gluconato
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	2-ceto-gluconato
5-ceto-gluconato	+	w	w	w	w	5-ceto-gluconato

[Tabla 3]

5 d	N.º 547	N.º 603	767S	767R	
Control	-	-	-	-	Control
Glicerol	-	-	-	-	Glicerol
Eritritol	-	-	w	w	Eritritol
D-Arabinosa	-	w	w	w	D-Arabinosa
L-Arabinosa	+	+	+	+	L-Arabinosa
D-Ribosa	+	+	+	+	D-Ribosa
D-Xilosa	+	+	+	+	D-Xilosa
L-Xilosa	-	w	-	w	L-Xilosa
D-Adonitol	-	w	-	-	D-Adonitol
Metil-BD-Xilopiranosido	+	+	+	+	Metil-BD-Xilopiranosido
D-Galactosa	-	-	+	+	D-Galactosa
D-Glucosa	w	+	+	+	D-Glucosa
D-Fructosa	w	w	+	+	D-Fructosa
D-Manosa	-	-	w	w	D-Manosa
L-Sorbosa	-	-	-	-	L-Sorbosa
L-Ramnosa	-	-	-	-	L-Ramnosa
D-Dulcitol	-	-	-	-	D-Dulcitol
Inositol	-	-	-	-	Inositol
D-Manitol	-	-	w	w	D-Manitol
D-Sorbitol	-	-	w	w	D-Sorbitol
Metil-AD-Manopiranosido	-	-	-	-	Metil-AD-Manopiranosido
Metil-AD-Glucopiranosido	-	-	w	w	Metil-AD-Glucopiranosido
N-Acetil glucosamina	-	-	-	-	N-Acetil glucosamina
Amigdalina	-	-	-	-	Amigdalina
Arbutina	-	-	-	-	Arbutina
Citrato férrico de esculina	-	-	-	-	Citrato férrico de esculina
Salicina	-	-	-	-	Salicina
D-Celobiosa	-	-	-	-	D-Celobiosa
D-Maltosa	-	-	w	+	D-Maltosa
D-Lactosa	-	-	w	w	D-Lactosa
D-Melibiosa	-	-	+	+	D-Melibiosa
D-Sacarosa	-	-	+	w	D-Sacarosa
D-Trehalosa	-	-	-	-	D-Trehalosa
Inulina	-	-	-	-	Inulina
D-Melecitosa	-	-	-	-	D-Melecitosa
D-Rafinosa	-	-	w	+	D-Rafinosa
Almidón	-	-	-	-	Almidón
Glucógeno	-	-	-	-	Glucógeno
Xilitol	-	-	w	w	Xilitol
Gentiobiosa	-	-	-	-	Gentiobiosa
D-Turanosa	-	-	-	-	D-Turanosa
D-Lixosa	-	-	-	-	D-Lixosa
D-Tagatosa	-	-	-	-	D-Tagatosa
D-Fucosa	-	-	-	-	D-Fucosa
L-Fucosa	-	-	-	-	L-Fucosa
D-Arabitol	-	-	+	+	D-Arabitol
L-Arabitol	-	-	-	-	L-Arabitol
Gluconato	-	-	w	w	Gluconato
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	2-ceto-gluconato
5-ceto-gluconato	w	w	w	w	5-ceto-gluconato

- 5 Cabe destacar que se ha confirmado que las cepas 767S y 767R tienen propiedades de asimilación de lactosa, así como propiedades de asimilación de sacarosa no mostradas por la cepa convencional. Además, las cepas 547 y 603 se caracterizan por propiedades de baja asimilación de galactosa y glucosa.

<6. Exploración terciaria de *Lactobacillus diolivorans*>

Como se ha descrito anteriormente, se seleccionaron las cepas 767S y 767R, mediante la exploración secundaria, en función de su capacidad para inhibir la levadura en el ensilaje. Esta prueba se aplicó de nuevo a cepas conservadas de *Lactobacillus diolivorans* que los inventores de la presente invención habían separado del ensilaje, para una exploración terciaria basada en la acción antilevadura. Las cepas sometidas a la prueba son las siguientes:

Se probaron las 16 cepas de 126, 128, 183, 187, 518, 547, 574, 586, 602, 603, 617, 707, 746, 767S, 767R y Oda 2.

## (I) Método de prueba

## 1) Preparación de solución de células de bacterias ácido lácticas trituradas

Como en la prueba en 4 anterior, se inocularon 100 µl de una solución de cultivo MRS de cada *Lactobacillus diolivorans* en una mezcla 1:1 de medio de cultivo líquido MRS (Difco) y medio de cultivo de caldo de maíz al 10 % en polvo, y se cultivaron a 37 °C durante cinco días.

La solución de cultivo se centrifugó a 3000 G durante 15 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante, se añadió 1 ml de PBS (-) a los sedimentos y las células se trituraron usando un desintegrador ultrasónico con enfriamiento en hielo. La solución de células trituradas se centrifugó a 3000 G durante 15 minutos y el sobrenadante de la solución de células trituradas se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µm y se esterilizó.

A continuación, se añadieron 10 µl del sobrenadante mencionado anteriormente, 180 µl de medio de cultivo YNB (pH 4,0) que contenía glucosa al 0,1 % y 100 µl de fuente de carbono 100 mM (ácido láctico o ácido acético) a una microplaca de 96 pocillos, en la que se inocularon 2 µl de solución de cultivo YPD de levadura y se cultivaron a 27 °C durante 48 horas. Para la levadura, se usó *Pichia fermentans* (Pf) cuando se usó ácido láctico como fuente de carbono, mientras que se usó *Issatchenkia orientalis* (Ck) cuando se usó ácido acético como fuente de carbono.

Al final del cultivo, cada pocillo se mezcló/agitó completamente mediante pipeteo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm usando un lector de microplacas. En función de la prueba antilevadura anterior, se determinó un resultado de exploración de 0,35 o menos absorbancia tanto en el medio de cultivo de ácido láctico como en el medio de cultivo de ácido acético como una indicación de la acción antilevadura/de inhibición de la levadura.

## 2) Resultados

La FIG. 3 muestra la evaluación (absorbancia) de la acción antilevadura basada en el ácido láctico (AL) como fuente de carbono, mientras que la FIG. 4 muestra la evaluación (absorbancia) de la acción antilevadura basada en el ácido acético (AA) como fuente de carbono. Además, se creó un gráfico de dispersión, representando el eje de abscisas la absorbancia de AA y representando el eje de ordenadas la absorbancia de AL. Este gráfico de dispersión se muestra en la FIG. 5. Al usar el gráfico de dispersión, los efectos contra especies de levadura de diferentes tipos se pueden determinar simultáneamente.

Como resulta evidente a partir de las FIGS. 3, 4 y 5, las cepas 547, 602, 603, 707, 767S y 767R se exploraron como cepas de *Lactobacillus diolivorans* que cumplieran con el indicador de crecimiento de levadura de 0,35 o menor absorbancia.

Además, los resultados de la prueba usando los ejemplos que se muestran a continuación revelaron que el *Lactobacillus diolivorans* con acción antilevadura se puede explorar usando una levadura de prueba de Pf o Ck. En otras palabras, la prueba de eficacia antilevadura mencionada anteriormente es un método excelente para explorar bacterias ácido lácticas que tengan una acción para inhibir la fermentación secundaria del ensilaje (aumento de la temperatura del ensilaje) después de la apertura.

## &lt;6. Fabricación de aditivos para ensilaje con las cepas 767S, 767R, 603 y 547&gt;

## 1. Cultivo de células bacterianas

En los ejemplos a continuación, los aditivos de ensilaje se fabricaron usando las cepas 767S, 767R, 603 y 547 considerando la tasa de crecimiento de las bacterias ácido lácticas, etc.

El medio de cultivo líquido de peptona de extracto de levadura de glucosa que se muestra en la tabla 4 a continuación se ajustó a pH 5,5 y después se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. El medio de cultivo se preparó en diferentes cantidades de 10 ml para cultivo de activación, 8 l para inoculación y 1600 l para cultivo principal.

Se inoculó un asa de inoculación de células de cada bacteria conservada a -80 °C en el medio de cultivo de activación y se cultivó a 37 °C durante 24 horas. Al final del cultivo, se inocularon 8 ml de la solución de cultivo de activación en

8 l del medio de inoculación y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. De nuevo, al final del cultivo, la cantidad total de la solución de cultivo de inoculación se añadió a 1600 l del medio de cultivo principal y se cultivó a 37 °C durante 24 horas.

5 [Tabla 4]

Componente	Relación
Glucosa	2,00 %
Extracto de levadura	1,00 %
Peptona	1,00 %
Sulfato de hierro	0,01 %
Sulfato de magnesio	0,01 %
Sulfato de manganeso	0,01 %

Composición del medio de cultivo

## 2. Liofilización de células bacterianas

10 Como resultado del cultivo principal, se obtuvo una solución de cultivo de  $6,0 \times 10^9$  UFC/ml de densidad celular bacteriana por 1600 l. Toda la solución de cultivo se centrifugó en una centrifuga continua, para obtener un concentrado de células bacterianas de  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/ml por 40 l. Los 40 l de concentrado de células bacterianas se añadieron a 80 l de una solución de trehalosa al 15 % que se había esterilizado a 121 °C durante 15 minutos y después se dejó enfriar, después de lo cual la mezcla se suspendió a 15 °C durante 30 minutos, se congeló a -30 °C y se conservó en estado congelado hasta que finalmente se liofilizó. Las células bacterianas congeladas se liofilizaron usando métodos ordinarios. El polvo liofilizado obtenido tenía un recuento de células vivas de  $2,4 \times 10^{11}$  UFC/g.

## 3. Fabricación de polvo para preparar ensilaje

20 El polvo liofilizado recogido se midió para el recuento de células vivas y después se mezcló con un polvo de trehalosa hasta que se alcanzó  $2 \times 10^{11}$  UFC/g. Los polvos preparados de este modo a partir de la cepa 767S, la cepa 767R, la cepa 603 y la cepa 547 se denominan ejemplo 1, ejemplo 2, ejemplo 3 y ejemplo 4, respectivamente, a continuación.

25 Cabe destacar que estos polvos también representan materiales centrales de polvos para preparar ensilaje. Se diluyen de 5 a 1000 veces con trehalosa, carbonato de calcio, zeolita u otro polvo, para obtener aditivos de ensilaje.

### <7. Prueba de eficacia del polvo para preparar ensilaje (1)>

#### (1) Muestras de prueba

30 Los polvos de los ejemplos 1 a 4 se usaron para preparar ensilaje con el fin de confirmar la eficacia. Además, un polvo preparado de la misma manera a partir de la cepa de *Lactobacillus buchneri* NK-01 usada en "Silo SP", una formulación de bacterias ácido lácticas para preparar ensilaje comercializada por Snow Brand Seed Co., LTD., se usó como ejemplo comparativo.

#### (2) Preparación de ensilaje

40 En un proceso de preparación de ensilaje de maíz, cada uno de los polvos de bacterias ácido lácticas en los ejemplos 1 a 4 y el ejemplo comparativo se añadió y se mezcló hasta que se logró un recuento de células de bacterias ácido lácticas de  $10^6$  UFC/g por material de ensilaje, después de lo cual la mezcla se cargó y se selló en frascos de prueba de 1 l por aprox. 800 g cada uno y se conservó durante dos meses en dos condiciones de 25 °C y 15 °C, para preparar ensilaje. Después de los dos meses, se abrieron las botellas y se realizaron las siguientes pruebas. Cabe señalar que se prepararon tres frascos de prueba en cada ejemplo. ...

#### (3) Prueba de calidad del ensilaje

50 No se observó fermentación anómala en ninguno de los frascos. De cada ensilaje se midió el pH, el contenido de ácido láctico (AL), el contenido de ácido acético (AA) y el contenido de ácido succínico (AS) usando métodos ordinarios, para evaluar la calidad del ensilaje. También se comprobó el nivel de olor a fermentación. La FIG. 6 muestra las cualidades del ensilaje después de la conservación a 25 °C, mientras que la FIG. 7 muestra las cualidades del ensilaje después de la conservación a 15 °C.

55 Todas las muestras de ensilaje conservadas a 25 °C de los ejemplos 1 a 4 mostraron un pH menor y, por tanto, fueron mejores, que la muestra del ejemplo comparativo 1 y la muestra sin aditivos. Se confirmó que también tenían un buen olor a ensilaje y no presentaban fermentaciones anómalas.

Las muestras de ensilaje conservadas a 15 °C en los ejemplos y el ejemplo comparativo no mostraron diferencias notables en la calidad.

(4) Prueba de fermentación secundaria después de la apertura

Tiempo hasta alcanzar los 30 °C después de la apertura, recuento de células de levadura inmediatamente después de la apertura, recuento de células de levadura de ensilaje conservado a 25 °C 2 días después de la apertura, recuento de células de levadura de ensilaje conservado a 15 °C 3 días después de la apertura.

1) Tiempo hasta alcanzar los 30 °C

Para las muestras de ensilaje de los ejemplos y el ejemplo comparativo, y la muestra sin aditivos, se midió el tiempo hasta alcanzar los 30 °C. Los resultados medidos se muestran como promedios y desviaciones típicas. Además, la prueba de significación estadística se realizó en cada ejemplo según la prueba de la t de Student (nivel de significación: 5 %), Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación y la FIG. 8.

[Tabla 5]

Tiempo hasta alcanzar los 30 °C (horas hasta la fermentación secundaria)

	Conservado a 25 °C			Conservado a 15 °C		
	Horas	Desviación típica	Prueba de la t	Horas	Desviación típica	Prueba de la t
Sin aditivos	31,33	2,89	a	33	4	a
Ejemplo comparativo (Silo SP)	33,67	1,15	a	31,67	0,47	a
Ejemplo 1 (767S)	184	0	b	57,33	8,99	ab
Ejemplo 2 (767R)	177,67	5,69	b	50,33	15,57	ab
Ejemplo 3 (603)	184	0	b	66,33	9,84	b
Ejemplo 4 (547)	184	0	b	41,67	4,99	ab

En la prueba de la t, existen diferencias significativas entre los grupos de diferentes símbolos.

Como se muestra en la tabla 5 y en la FIG. 8, la fermentación secundaria se inhibió notablemente en las muestras de ensilaje a las que se añadieron las formulaciones de bacterias ácido lácticas para ensilaje, proporcionadas en los ejemplos. Además, este efecto fue prominente en las muestras de ensilaje conservadas a 25 °C, que es una temperatura de preparación de ensilaje preferida, necesitando el ensilaje en los ejemplos aproximadamente seis veces más tiempo que el ensilaje en el ejemplo comparativo, para alcanzar los 30 °C. Esto corrobora que las muestras que se ajustan a la presente invención, como se proporcionan en los ejemplos, tienen una acción para inhibir la fermentación secundaria del ensilaje.

Según el ensilaje conservado a 15 °C, las muestras en los ejemplos tardaron aproximadamente 20 horas más que las muestras en el ejemplo comparativo y la muestra de control sin aditivos, antes de experimentar la fermentación secundaria.

2) Recuentos de células de levadura de ensilaje conservado a 25 °C inmediatamente después de la apertura y 2 días después de la apertura

Las muestras de ensilaje de los ejemplos y el ejemplo comparativo, y la muestra sin aditivos, se conservaron a 25 °C y después se midió el recuento de células de levadura inmediatamente después de la apertura y también 2 días después de la apertura. Los resultados medidos se muestran como promedios y desviaciones típicas. Además, la prueba de significación estadística se realizó en cada ejemplo según la prueba de la t de Student (nivel de significación: 5 %). Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

[Tabla 6]

Recuento de células de levadura, conservado a 25 °C

	Inmediatamente después de la apertura			2 días después de la apertura		
	Recuento de células de levadura Log (ufc/g)	Desviación típica	Prueba de la t	Recuento de células de levadura Log (ufc/g)	Desviación típica	Prueba de la t

Sin aditivos	4,85	0,08	c	8,54	0,03	b
Ejemplo comparativo (Silo SP)	3,6	1,73	bc	8,25	0,27	b
Ejemplo 1 (767S)	1,6	0	a	2,94	0,58	a
Ejemplo 2 (767R)	1,6	0	a	2,94	0,58	a
Ejemplo 3 (603)	1,6	0	a	2,6	0	a
Ejemplo 4 (547)	1,6	0	a	2,6	0	a

En la prueba de la t, existen diferencias significativas entre los grupos de diferentes símbolos.

5 La tabla 6 muestra que, con las muestras de ensilaje a las que se añadieron las formulaciones aditivas de bacterias ácido lácticas para ensilaje, proporcionadas en los ejemplos, el recuento de células de levadura inmediatamente después de la apertura fue tan bajo como 1/1000 o menos de los niveles de la muestra de ensilaje en el ejemplo comparativo y de la muestra de control (sin aditivos). Como resultado, el recuento de células de levadura 2 días después de la apertura fue tan bajo como 1/100 000 o menos de los niveles de la muestra de ensilaje en el ejemplo comparativo y de la muestra de control.

10 3) Recuentos de células de levadura de ensilaje conservado a 15 °C inmediatamente después de la apertura y 3 días después de la apertura

15 Las muestras de ensilaje de los ejemplos y el ejemplo comparativo, y la muestra sin aditivos, se conservaron a 15 °C y después se midió el recuento de células de levadura inmediatamente después de la apertura y también 3 días después de la apertura. Los resultados medidos se muestran como promedios y desviaciones típicas. Además, la prueba de significación estadística se realizó en cada ejemplo según la prueba de la t de Student (nivel de significación: 5 %). Los resultados se muestran en la tabla 7 a continuación.

[Tabla 7]

20 Recuento de células de levadura, conservado a 15 °C

	Inmediatamente después de la apertura			3 días después de la apertura		
	Recuento de células de levadura Log (ufc/g)	Desviación típica	Prueba de la t	Recuento de células de levadura Log (ufc/g)	Desviación típica	Prueba de la t
Sin aditivos	5,36	0,22	ab	8,44	0,23	ab
Ejemplo comparativo (Silo SP)	5,48	0,16	b	8,49	0,2	b
Ejemplo 1 (767S)	3,44	0,73	ab	7,11	1,11	ab
Ejemplo 2 (767R)	4,79	1,45	ab	7,82	0,51	ab
Ejemplo 3 (603)	3,04	1,28	a	5,82	1,93	a
Ejemplo 4 (547)	4,99	0,29	ab	8,1	0,32	ab

En la prueba de la t, existen diferencias significativas entre los grupos de diferentes símbolos.

25 Como se muestra en la tabla 7, el recuento de células de levadura fue menor con todas las muestras de ensilaje a las que se añadieron las formulaciones aditivas de bacterias ácido lácticas para ensilaje, proporcionadas en los ejemplos, comparado con la muestra de ensilaje en el ejemplo comparativo; sin embargo, el efecto no fue muy notable. Lo mismo ocurre con el recuento de levadura 3 días después de la apertura.

<8. Prueba de eficacia del polvo para la preparación de ensilaje (II) (Prueba de ensilaje fermentado a 15 °C)>

30 Se realizó otra prueba con respecto a la eficacia de las muestras que se ajustan a la presente invención, para inhibir la fermentación secundaria que de otro modo se produciría en la preparación del ensilaje a baja temperatura.

(1) Muestras de prueba

35 Los polvos de los ejemplos 1 a 3 y del ejemplo comparativo 1 se usaron para preparar ensilaje con el fin de confirmar la eficacia.

Además, el ensilaje se preparó usando un polvo preparado de la misma manera a partir de la cepa convencional de *Lactobacillus diolivorans* JCM12183 (proporcionada por RIKEN BioResource Center) usada en la presente invención, como ejemplo comparativo 2.

5 (2) Método de prueba

10 El ensilaje se preparó de la misma manera que en la prueba en 7, en donde el ensilaje se conservó durante dos meses a 15 °C, que es una condición de fermentación de ensilaje en regiones frías. El ensilaje se abrió después de dos meses y se sometió a la prueba de fermentación secundaria después de la apertura. En otras palabras, el tiempo hasta alcanzar los 30 °C después de la apertura se midió de la misma manera que en la prueba en 7.

(3) Resultados de la prueba

15 Los tiempos hasta alcanzar los 30 °C, basados en promedios de tres frascos, se muestran en la FIG. 9.

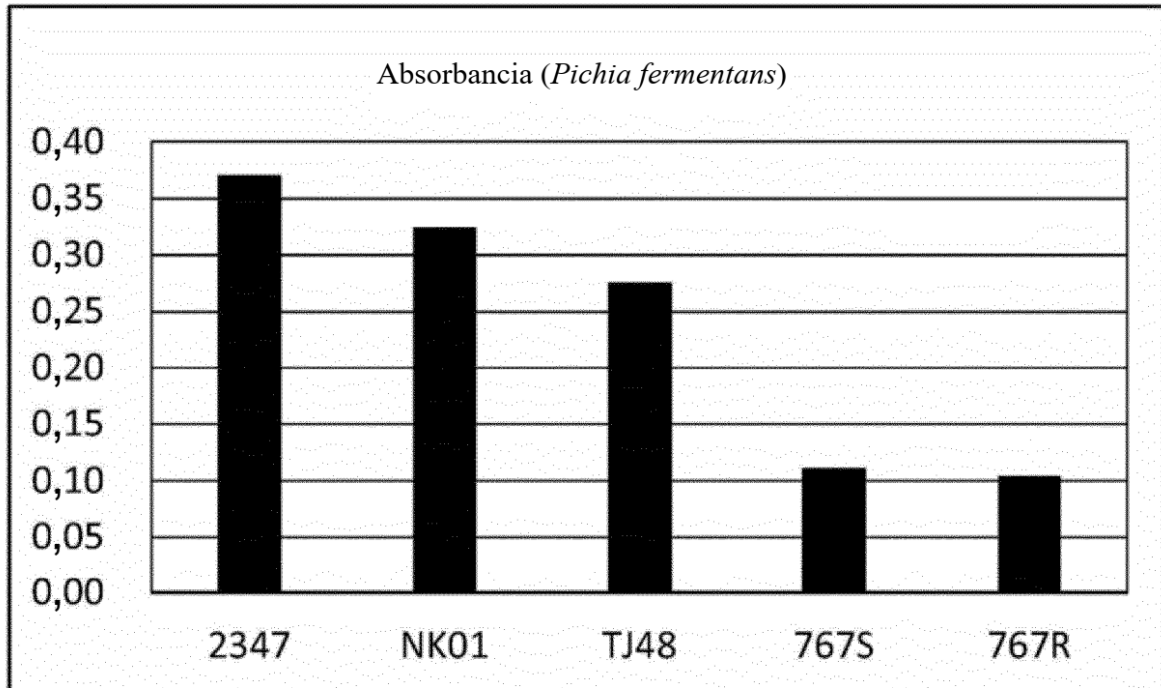
20 La muestra sin aditivos y la muestra del ejemplo comparativo 1 alcanzaron 30 °C en aproximadamente 30 horas. La muestra del ejemplo comparativo 2 alcanzó los 30 °C en 39 horas. Por otro lado, las muestras de los ejemplos 1 a 3 tardaron 50 horas o más en alcanzar los 30 °C, según los resultados. En otras palabras, los aditivos de ensilaje según la presente invención inhibieron la fermentación secundaria del ensilaje preparado a temperatura fría, más eficazmente que la cepa bacteriana conocida de preparación de ensilaje *Lactobacillus buchneri* NK-01 o la cepa convencional de *Lactobacillus diolivorans* JCM12183.

25 Las formulaciones aditivas de bacterias ácido lácticas para ensilaje según la presente invención inhibieron el crecimiento de levaduras en el ensilaje, aumento de la temperatura del ensilaje debido a la fermentación secundaria y descenso de la calidad del ensilaje después de la apertura. En particular, se confirmó que lograron estos resultados de manera muy eficaz en ensilaje fermentado a temperatura baja.

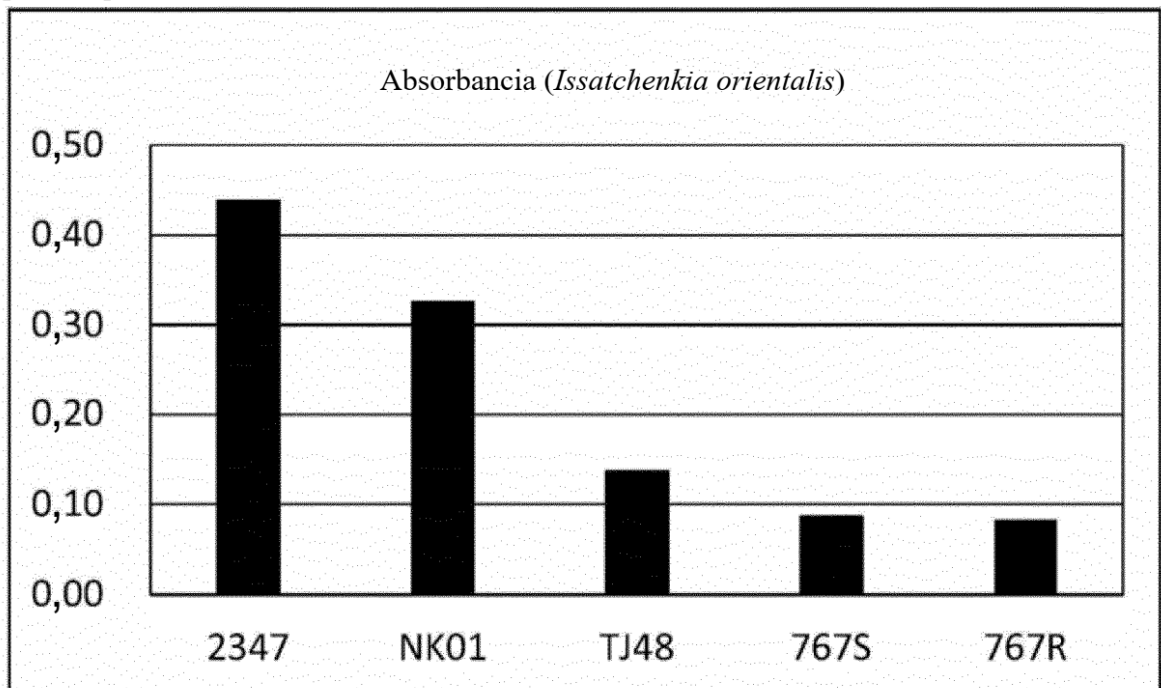
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una bacteria ácido láctica para preparar ensilaje, constituida por un *Lactobacillus diolivorans* que tiene acción antilevadadura, en donde el *Lactobacillus diolivorans* es la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0006 (NITE BP-02208), la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0007 (NITE BP-02209) o la cepa de *Lactobacillus diolivorans* SBS-0009 (NITE BP-02210).
2. Ensilaje que comprende la bacteria ácido láctica de *Lactobacillus diolivorans* según la reivindicación 1.
- 10 3. Un aditivo para preparar ensilaje, que comprende la bacteria ácido láctica de *Lactobacillus diolivorans* según la reivindicación 1.
4. Un método para preparar ensilaje, caracterizado por añadir el aditivo para preparar el ensilaje según la reivindicación 3 a un material de ensilaje.

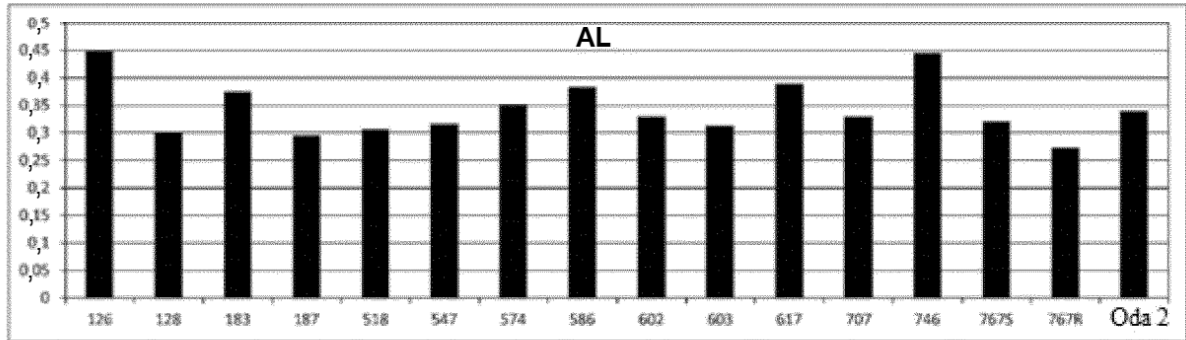
[FIG. 1]



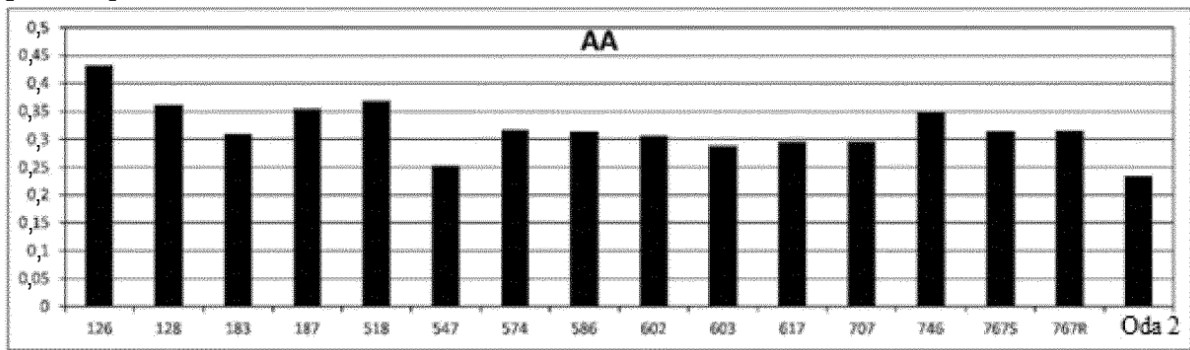
[FIG. 2]



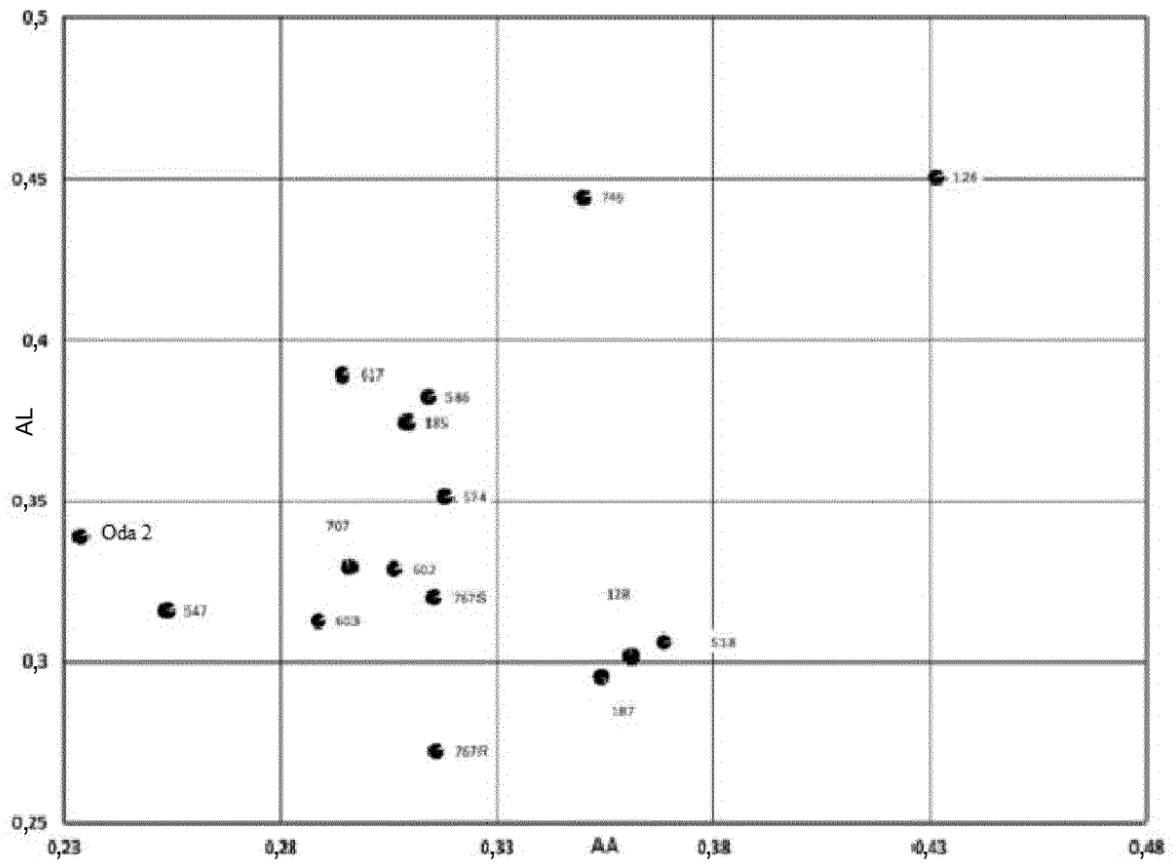
[FIG. 3]



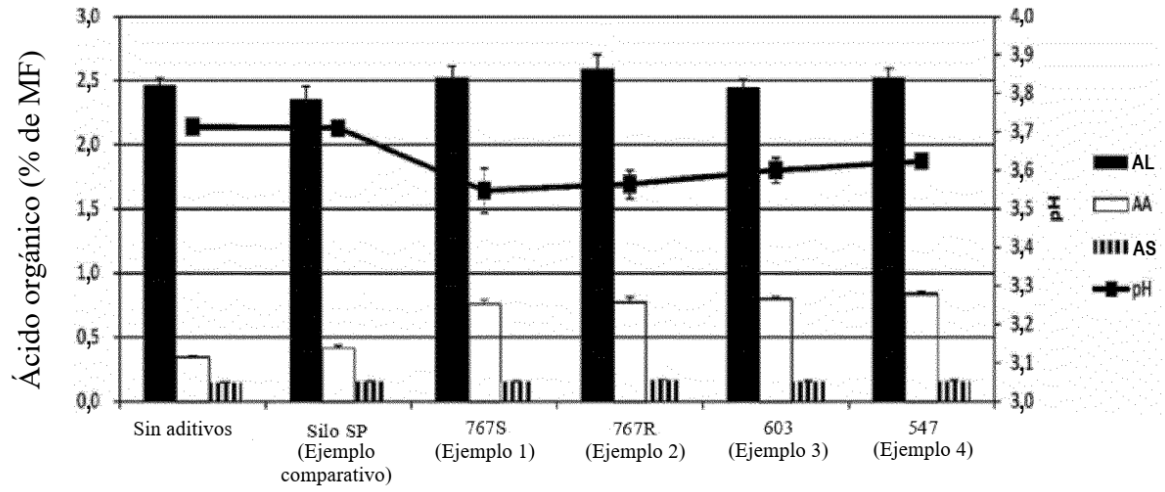
[FIG. 4]



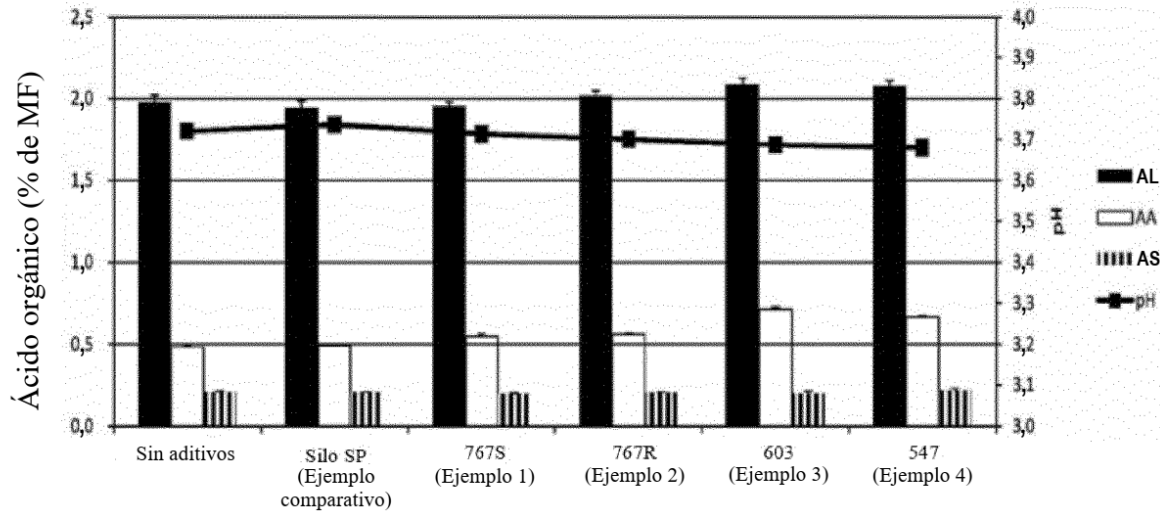
[FIG. 5]



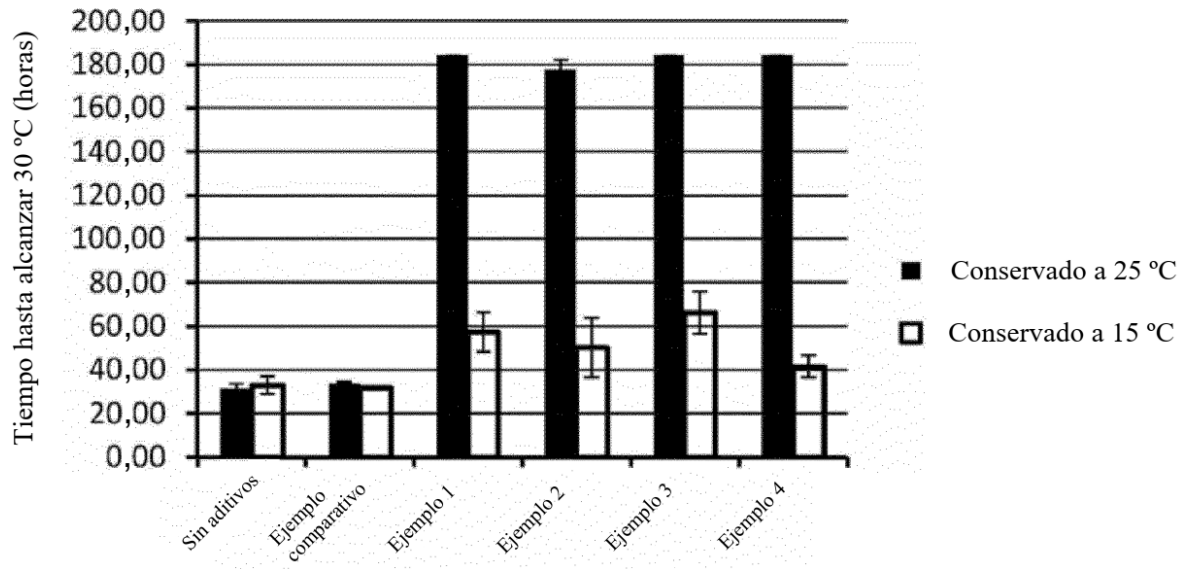
[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]



[FIG. 9]

