



NUMERO DE PUBLICATION : 1002673A3

NUMERO DE DEPOT : 9000346

Classif. Internat.: A23K

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 30 Avril 1991

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 28 Mars 1990 à 15h00  
à l' Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC.  
Capital Square 700 Locust Street 400, DES MOINES IOWA 50309(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)


représenté(e)s par : OVERATH Philippe, CABINET BEDE, Avenue Antoine  
Depage, 13 - B-1050 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE CONSERVATION DE PRODUITS ENSILES.

Priorité(s) 06.11.89 US USA 431883

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 30 Avril 1991  
PAR DELEGATION SPECIALE :

  
WUYTS L  
Directeur

PROCEDE DE CONSERVATION DE PRODUITS ENSILES.  
HISTORIQUE DE L'INVENTION

1. OBJET DE L'INVENTION.

1 La présente invention concerne un procédé pour  
conserver les produits agricoles utilisés pour  
l'alimentation des animaux après stockage dans des  
conditions anaérobies.

5

2. BREVE DESCRIPTION DE L'ETAT ANTERIEUR DE LA TECHNIQUE.

L'utilisation d'additifs d'ensilage est une  
pratique couramment appliquée par la plupart des  
agriculteurs. Pour comprendre comment les additifs  
10 d'ensilage réagissent avec les produits ensilés il peut  
être utile d'envisager tout d'abord les principales  
modifications biochimiques et microbiologiques qui se  
produisent au cours du processus d'ensilage. Immédiatement  
après la coupe, par exemple, du maïs, la respiration  
15 aérobique commence. Pendant cette première phase, les  
hydrates de carbone solubles des tissus végétaux sont  
oxydés et transformés en dioxyde de carbone et en eau.  
Ce processus continue jusqu'à ce que, soit la teneur en  
oxygène soit diminuée, soit les hydrates de carbone  
20 solubles dans l'eau soient épuisés. Dans des conditions  
idéales et si les produits ensilés sont emballés de  
manière appropriée et étanche, la respiration ne dure  
que quelques heures. La croissance des micro-organismes

1 pendant cette période est limitée à ceux qui tolèrent  
l'oxygène, c'est-à-dire les bactéries aérobies, les  
levures et les moisissures. Ces organismes sont  
généralement considérés comme ayant un effet défavorable  
5 sur le système vu qu'ils métabolisent le sucre pour  
produire du dioxyde de carbone, de la chaleur et de l'eau.

Une autre modification chimique importante  
qui se produit pendant cette phase précoce est la  
décomposition des protéines végétales par les protéases  
10 végétales. Les protéines sont dégradées en acides aminés  
et métabolisées ensuite pour donner de l'ammoniac et  
des amines. On a signalé que jusqu'à 50% du total des  
protéines pouvaient être décomposées pendant ce processus,  
en fonction de la vitesse de diminution du pH dans le  
15 produit ensilé.

Dès que des conditions anaérobies sont  
réalisées, les bactéries anaérobies prolifèrent. Les  
entérobactéries et les bactéries hétérofermentantes de  
l'acide lactique sont généralement les premières  
20 populations qui s'établissent. Ces organismes produisent  
essentiellement de l'acide acétique, de l'éthanol, de  
l'acide lactique et du dioxyde de carbone par fermentation  
du glucose et du fructose. Lorsque le pH commence à  
diminuer, on observe une augmentation marquée de la  
25 population des bactéries homofermentantes de l'acide  
lactique, qui donnent essentiellement de l'acide lactique.  
L'augmentation rapide du niveau d'acide lactique donne  
lieu à une diminution du pH jusqu'à environ 4. A ce  
moment, la masse ensilée reste généralement stable pendant  
30 tout le stockage, si elle n'est pas perturbée.

En résumé, si le produit est initialement  
emballé dans une construction limitant l'apport d'oxygène,  
telle qu'un silo fermé, le pH est réduit, l'oxygène  
résiduel est utilisé et le produit subit une fermentation  
35 donnant de l'acide lactique. La matière ensilée restera

1 stable et pourra être stockée dans cet état pendant  
plusieurs mois.

Lorsque le produit ensilé est prêt pour être  
distribué, le couvercle supérieur est enlevé et le silo  
5 est ouvert pour y puiser. Le produit est alors exposé  
à l'air et le processus n'est plus anaérobie. La  
microflore dans le produit ensilé lui-même ou les  
contaminants provenant de l'atmosphère peuvent commencer  
à oxyder les acides présents. Cette oxydation donne lieu  
10 à une perte de masse ou de matière sèche des aliments  
et provoque donc une perte de valeur nutritive. En outre,  
le pH résultant et l'augmentation des températures ne  
conviennent pas aux animaux et les aliments seront refusés  
par ceux-ci après le début de leur réchauffement.  
15 L'incidence de l'instabilité aérobie observée en pratique  
dépend de la cadence d'enlèvement du matériau stocké  
dans le silo et de la durée de stockage du produit qui  
a précédé l'ouverture du silo. Si le produit ensilé est  
enlevé lentement, la surface du produit dégagé est exposée  
20 pendant un temps prolongé qui permet la détérioration.  
Des durées d'ensilage plus longues permettent généralement  
d'augmenter la stabilité du produit ensilé vu que les  
concentrations d'acide sont plus élevées et que toutes  
les populations de la microflore tendent à diminuer.  
25 D'une manière générale, le produit ensilé doit rester  
stable pendant au moins cinq jours après l'ouverture  
du silo. Ceci assure un intervalle de temps suffisant  
pour vider le silo.

On a découvert récemment que des inoculants  
30 bactériens facilitent la conservation du produit ensilé,  
y compris l'herbe et le maïs ensilés. Par exemple,  
l'inoculation par les bactéries de l'acide lactique  
pendant la phase de fermentation peut favoriser le  
processus de fermentation comme l'a mentionné, par  
35 exemple, le brevet U.S. 4.842.871 de Hill publié le 27

1 juin 1989 et comme indiqué également dans les références  
bibliographiques citées dans ce brevet. Pour ce qui  
concerne la stabilité du maïs avec humidité élevée, cette  
augmentation est probablement due au fait que l'inoculant  
5 augmente la vitesse de la fermentation anaérobie et la  
diminution du pH. Ceci est un élément favorable parce  
que les pertes par oxydation causées par la microflore  
aérobie sensible au pH au cours des phases initiales  
sont donc évitées. Dans le cas d'autres produits ensilés  
10 tels que des plants de maïs entiers, l'alfa, etc.,  
l'inoculant peut également avoir des effets défavorables  
sur la digestibilité des matières ensilées, à cause d'une  
augmentation de la disponibilité de la fibre.

Il n'existe actuellement pas d'inoculant  
15 disponible pour assurer la stabilité au cours de la  
seconde partie du processus qui se produit lorsque le  
silo est exposé à l'air. Une raison du manque d'un  
inoculant efficace est le caractère antagoniste des  
conservants aérobies et anaérobies. Chacun d'eux peut  
20 entraver le fonctionnement de l'autre.

Par conséquent, la présente invention a pour  
objectif essentiel de mettre au point un inoculant  
bactérien pour produits ensilés qui est efficace tant  
au cours des phases initiales anaérobies que pendant  
25 les phases aérobies initiales lorsque le silo est exposé  
à l'air.

Un autre objectif de la présente invention  
consiste à mettre au point un inoculant pour produits  
ensilés qui est efficace dans les deux phases,  
30 l'inoculateur de la deuxième phase étant également un  
organisme anaérobie et étant un organisme qui n'entrave  
en aucune manière l'inoculant à base de bactéries  
produisant de l'acide lactique agissant au cours de la  
phase anaérobie initiale et qui peuvent être présentes.

35 Un autre objectif de la présente invention

1 consiste à proposer un inoculant pour produits ensilés  
contenant certaines espèces de Propionibacteria qui se  
sont avérées agir efficacement dans un milieu contenant  
des bactéries de l'acide lactique, mais sans entraver  
5 le fonctionnement de celles-ci. Ceci permet d'obtenir  
une efficacité de conservation des produits ensilés tant  
pendant la phase anaérobie initiale que pendant la phase  
aérobie ultérieure, à cause des produits du métabolisme  
de la Propionibacteria.

10 Le procédé et la manière d'atteindre chacun  
de ces objectifs propres à la présente invention ainsi  
que d'autres encore apparaîtront plus clairement à  
l'examen de la description détaillée ci-après.

15 RESUME DE L'INVENTION.

Dans la présente invention, le produit ensilé,  
y compris l'herbe et/ou le maïs ensilés sont conservés  
pendant la phase anaérobie initiale du processus  
d'ensilage ainsi que pendant les phases initiales à l'état  
20 aérobie après l'ouverture du silo. La conservation est  
réalisée en mélangeant certains inoculants bactériens  
de phase anaérobie qui produisent des produits de  
métabolisme qui ont pour résultat d'assurer une stabilité  
continue au cours de la fonction en phase aérobie.  
25 L'inoculant est la Propionibacteria qui présente, comme  
caractéristique importante, d'être compatible avec les  
autres bactéries de phase anaérobie et donc de ne retarder  
en aucune manière le processus d'ensilage. L'inoculant  
bactérien ajouté pour la conservation en phase anaérobie  
30 est le Lactobacillus, qui produit de l'acide lactique  
au cours de la fermentation. La Propionibacteria est  
également anaérobie mais les produits de son métabolisme  
assurent la stabilité en phase aérobie. De préférence,  
ces bactéries sont de l'espèce Propionibacterium jensenii  
35 ou les équivalents génétiques de celle-ci.

1           En résumé, la présente invention propose un  
procédé pour traiter les produits ensilés qui comprend  
la production, dans le produit ensilé, d'une quantité  
faible mais efficace de conservateurs de produits ensilés  
5           constitués d'une espèce déterminée de Propionibacteria  
et plus particulièrement jensenii et, plus  
particulièrement, des souches P-9 et P-Fargo ayant  
respectivement les numéros ATCC 53961 et 53962, de  
préférence en combinaison avec des organismes produisant  
10          de l'acide lactique.

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

          Les pertes de produits agricoles tels que foin,  
maïs et analogues causées par la détérioration due à  
15          la croissance des organismes nocifs constituent un grave  
problème pour le monde agricole. Par exemple, lorsque  
le maïs est stocké dans un silo à humidité élevée, le  
produit ensilé résultant présente une valeur nutritive  
notablement plus faible et une quantité souvent plus  
20          élevée de moisissures visibles.

          Le terme "produit ensilé" utilisé ici est censé  
s'appliquer à tous les types de produits agricoles  
fermentés tels que herbe ensilée, alfa ensilé, maïs  
ensilé, sorgho ensilé, céréales fermentées et mélanges  
25          d'herbes, etc. Tous ceux-ci peuvent être traités avec  
succès en utilisant l'inoculant de la présente invention.

          Conformément au procédé de la présente  
invention, le produit ensilé est traité avec une quantité  
efficace de conservant d'ensilage constitué de l'organisme  
30          Lactobacillus, comme déjà décrit dans le brevet  
U.S. 4.842.871 publié le 27 juin 1989.

          Toutefois, comme mentionné ci-dessus, pour obtenir une  
efficacité maximale du conservateur d'ensilage, on ne  
peut pas négliger les conditions aérobies qui se  
35          présentent lorsque le silo est ouvert ou lorsque le

1 produit ensilé est retiré du silo et placé dans les  
réservoirs à aliments. Il est assez courant que les  
produits qui étaient stables dans les conditions  
anaérobies subissent une détérioration rapide lorsqu'ils  
5 sont exposés à l'air.

On a découvert avec surprise que si un inoculant  
d'ensilage comprend une fraction d'inoculant bactérien  
anaérobie classique tel qu'un organisme Lactobacillus  
et une autre fraction d'organe de certains organismes  
10 inoculants bactériens anaérobies dont les fonctions  
métaboliques ont pour effet d'assurer la conservation  
dans des conditions aérobies, la préservation est assurée  
à la fois pendant la phase aérobie et la phase anaérobie  
sans que l'on observe un quelconque effet antagoniste  
15 d'une caractéristique sur l'autre.

Un aspect surprenant de la présente invention  
consiste en ce que seule une espèce déterminée de  
Propionibacteria est réellement efficace dans le cadre  
de la présente invention. L'addition de Propionibacteria  
20 au produit ensilé est connue d'une manière générale et  
a déjà été décrite, par exemple, par Flores-Galarza et  
B.A. Glatz, J. FOOD PROTECTION 48:408-411 (1985). En  
outre, la même revue contient un article de Parker et  
cette invention, N.J. Moon, "Interactions of Lactobacillus  
25 and Propionibacterium in Mixed Culture", J. FOOD  
PROTECTION, 45:326-330 (1982). Cet article diffère de  
la présente invention en ce qu'il s'agit d'espèces  
différentes de Propionibacteria et que les espèces de  
l'article de 1982 ne conviennent pas pour les applications  
30 dans le cadre de la présente invention. Si on utilise  
d'autres espèces de Propionibacteria que celles indiquées  
ici, on n'obtient aucun résultat à l'état aérobie et,  
en fait, l'interaction de cette combinaison peut être  
pire mais certainement pas meilleure.

35 En résumé, la présente invention est

1 nécessairement liée à une espèce déterminée pour ce qui  
concerne les Propionibacteria. Plus particulièrement, les  
espèces de Propionibacteria qui sont efficaces dans le  
cadre de la présente invention sont : Propionibacterium  
5 jensenii et, de préférence encore, Propionibacterium  
jensenii souche P-Fargo et Propionibacterium jensenii  
souche P-9. Il est toutefois entendu que la présente  
invention, bien qu'elle soit liée à certaines espèces,  
a pour objectif d'englober l'ensemble de ces espèces  
10 et leurs équivalents génétiques ou les mutants efficaces  
de ceux-ci qui présentent les caractéristiques désirées  
propres aux espèces ou souches mentionnées. Ces  
équivalents génétiques ou mutants de ceux-ci sont  
considérés comme étant fonctionnellement équivalents  
15 de l'espèce parente. Tous les spécialistes de cette  
technique savent que la mutation spontanée est un  
phénomène courant dans les micro-organismes et que des  
mutations peuvent être provoquées intentionnellement  
par différentes techniques bien connues. Par exemple,  
20 on peut obtenir des mutants en utilisant des techniques  
chimiques radioactives et de recombinaison.

Quelle que soit la manière dont les mutations  
des équivalents génétiques sont provoquées, le critère  
essentiel est que ces équivalents ou mutants puissent  
25 conserver les produits ensilés de la manière décrite  
pour l'espèce et/ou la souche parente. En d'autres termes,  
la présente invention comprend des mutations qui donnent  
lieu à de faibles modifications telles que, par exemple,  
des altérations taxinomiques mineures.

30 Les compositions typiques utiles pour la mise  
en oeuvre de la présente invention peuvent comprendre  
les organismes Lactobacillus avec des doses utiles pour  
traiter les produits ensilés, c'est-à-dire normalement  
10<sup>8</sup> - 10<sup>14</sup> organismes viables par tonne et, de préférence,  
35 10<sup>10</sup> - 10<sup>12</sup> organismes viables par tonne.

1                    Pour ce qui concerne le Propionibacterium  
                      jensenii et les souches particulièrement préférées P-9  
                      et P-Fargo, la quantité d'organismes viables par tonne  
                      de produit ensilé doit être comprise dans la gamme  
5 d'environ  $10^8$  -  $10^{14}$  organismes par tonne et, de  
                      préférence, d'environ  $10^{10}$  -  $10^{12}$  organismes par tonne.  
                      Si on le souhaite, les Propionibacteria peuvent être  
                      utilisées seules mais il est préférable de les utiliser  
                      en combinaison avec des organismes produisant de l'acide  
10 lactique.

                      La composition de la présente invention peut  
                      également comprendre d'autres organismes usuels de  
                      conservation des produits ensilés tels que, par exemple,  
                      Lactobacillus, Streptococcus et Pediococcus et certaines  
15 enzymes provenant des champignons ou des bactéries, à  
                      condition qu'ils ne soient absolument pas antagonistes  
                      des organismes aérobies actifs.

                      Tous les spécialistes de cette technique  
                      connaissent d'autres supports appropriés et d'autres  
20 modes de dosage ou seront capables de déterminer ceux-  
                      ci en utilisant l'expérimentation de routine. D'autre  
                      part, l'introduction des différentes compositions peut  
                      être réalisée en utilisant des techniques classiques  
                      connues de tous les spécialistes de cette technique telles  
25 que pulvérisation, saupoudrage, etc.

                      La description ci-dessus définit la présente  
                      invention. Les détails de celle-ci peuvent être mieux  
                      compris à l'aide des exemples particuliers ci-après,  
                      présentés uniquement à titre exemplatif et sans présenter  
30 aucun caractère limitatif, sauf spécification contraire.

#### EXEMPLES

                      Dans les essais d'exemples indiqués dans le  
                      tableau ci-après, le traitement, la préparation et le  
35 stockage ont été réalisés comme suit. Les espèces de

1 Propionibacteria utilisées dans les essais d'ensilage  
effectués au cours des années 1986, 1987 et 1988  
incluent les deux espèces Propionibacterium jensenii  
P9 et P-Fargo ainsi que d'autres Propionibacteria à titre  
5 de comparaison. Les espèces de Propionibacterium jensenii  
sont couramment disponibles dans la collection des  
cultures de l'Iowa State University et sont déposées  
dans la collection des cultures-types américaines (ATCC)  
sous les numéros de dépôt 53961 et 53962. Dans les essais,  
10 P.shermanii avec désignation P-19 et P. thoenii avec  
désignation P-8 ont été utilisés à titre de comparaison  
pour obtenir des données démontrant que seul le P.jensenii  
ou son équivalent génétique est satisfaisant pour la  
présente invention. Les teneurs en inoculants étaient  
15 de  $10^5$  par gramme. Ceci correspond à  $10^{11}$  organismes  
par tonne. Les traitements ont été appliqués sous forme  
d'un liquide.

Les céréales traitées étaient divisées en  
fractions égales et emballées dans des seaux en plastique  
20 de 5 gallons avec des couvercles à joints étanches en  
caoutchouc. Les couvercles étaient pourvus d'une soupape  
de sûreté permettant aux gaz de s'échapper tout en  
maintenant des conditions anaérobies. Les seaux ont été  
stockés à 20-25°C pendant 30 à 120 jours avant  
25 l'ouverture, avant de simuler les conditions d'ensilage.

Les seaux ouverts ont été examinés pour détecter  
visuellement les différences de couleur et les odeurs  
et ont été vidés sur une feuille de plastique propre.  
Les céréales ont été mélangées et les échantillons ont  
30 été prélevés pour l'analyse chimique et microbiologique.  
Les céréales restantes ont été divisées en deux fractions  
de 500 g et placées dans des récipients en mousse de  
polystyrène, spécialement fabriqués de manière à avoir  
des parois de 2" (5 cm) capables de conserver la chaleur.  
35 a placé des thermistors au centre de la masse de chaque

1 récipient et la température a été mesurée toutes les heures pendant 7 à 10 jours. On a déterminé le pH deux fois par jour en utilisant un pH-mètre à pointe de lance.

Les populations d'organismes aérobies, de  
5 microaérophiles, de lactobacilles, de streptocoques, d'utilisateurs de lactates, de coliformes, de levures et de moisissures et d'actinomycètes ont été déterminées en utilisant des milieux et des conditions appropriés (par exemple TSA, MRS, MS, NAL, RBC, NBARC). On a  
10 déterminé les populations dans les céréales au moment de l'ensilage et lorsque le produit ensilé était exposé à l'air au jour 0 des déterminations de la stabilité aérobie.

La valeur nutritive des échantillons a été  
15 déterminée au début du processus d'ensilage et lorsque les céréales ont été exposées à l'air pour déterminer la stabilité aérobie. Les paramètres de nutrition usuels, y compris ADF<sub>N</sub>, NDF, N, ASH ont été déterminés. Les acides de la fermentation ont été déterminés le jour  
20 de l'ouverture, en vue de déterminer la stabilité aérobie.

Dans les cas où il existait une combinaison avec les bactéries Lactobacillus, on a utilisé un produit commercial de Pioneer Hi-Bred International, Inc., disponible couramment et désigné sous le nom de Pioneer  
25 Brand 1186. Le Pioneer Brand 186 est une variété d'inoculant de maïs à humidité élevée qui contient le Lactobacillus plantarum déjà décrit dans le brevet U.S. 4.842.871. Cette publication est mentionnée ici à titre de référence.

30 Les tableaux 1, 2 et 3 ci-dessous donnent un résumé des résultats des essais. "L'échantillon-témoin" n'avait pas d'inoculant, l'échantillon "1186" ne contenait pas de Propionibacteria, le P-8 est une espèce différente de celle de l'invention, comme P-19. "PF"  
35 désigne P-Fargo. Les données indiquent qu'il faut

1 généralement plus de temps pour obtenir une augmentation  
de pH supérieure à 5,0 et une augmentation de température  
de 1,5°C pour le produit ensilé exposé à l'air et  
contenant le Propionibacterium jensenii, et que P-8 et  
5 P-19 n'agissent pas en présence de 1186 et peuvent même  
avoir un effet antagoniste de l'action du 1186 pris  
isolément.

Dans les études de 1987 (tableau 3) on a utilisé  
des souches supplémentaires seules ou en combinaison  
10 avec le 1186 et les produits ensilés ont été exposés  
à l'air après 60 jours. Au cours de ces études, la plupart  
des produits ensilés aérobiquement stables étaient ceux  
traités avec Propionibacterium sp. seul : P-9, P-Fargo  
et P-8. Ces produits présentaient une stabilité du pH  
15 et de la température pendant 8 jours, l'expérience ayant  
été interrompue à ce moment. Le produit le moins stable  
était l'échantillon-témoin non inoculé qui présentait  
une instabilité immédiate du pH et une augmentation de  
la température. P-19 + 1186 a présenté une instabilité  
20 immédiate du pH et une augmentation de la température.  
P-19 + 1186 et 1186 sont restés stables environ un jour  
de plus que l'échantillon-témoin. Les autres mélanges  
présentaient une stabilité intermédiaire pour ce qui  
concerne le pH et la température.

25 Des mélanges de chaque souche de Propionibacteria  
et de 1186 étaient moins stables que l'une quelconque  
des souches pures de Propionibacteria et présentaient  
des teneurs plus faibles en acides propioniques. Par  
conséquent, on a observé au cours de ces essais une  
30 réaction antagoniste à l'inoculation de 1186 et de  
certaines souches de Propionibacteria, mais ce n'était  
pas le cas avec P-9 et P-Fargo.

En 1988 on a utilisé un programme identique  
pour les essais, sauf que l'on a prévu des durées  
35 d'exposition à l'air supplémentaires afin d'évaluer la

- 1 progression de la fermentation et l'effet sur la stabilité et on a utilisé uniquement deux souches de Propionibacteria, c'est-à-dire P-8 et P-9. P-9 était efficace en combinaison avec 1186 mais non P-8.
- 5 Les tableaux 1 et 2 donnent des résumés des essais effectués en 1986 - 1988 et concernant les effets de traitement sur la stabilité du maïs à humidité élevée. La stabilité est définie comme étant le temps requis pour que l'augmentation du pH devienne supérieure à 5,0
- 10 et que la température interne augmente de 1,5°C par rapport au milieu ambiant.

TABLEAU 1

Année	Jour d' ouverture		Traitement					
			Témoin	1186	P-9	1186+P-9	P8	P8+1186
1986	34	pH	103	89				
		temp	65	83				
1987	60	pH	79	120	>168	144	>168	138
		temp	38	62	>168	82	149	82
1988	35	pH	72	55	84	72	79	70
		temp	50	43	60	55	50	55
	95	pH	108	110	120	156	108	89
		temp	68	76	72	82	60	48
	140	pH	>240	240	180	240	>240	>240
		temp	>240	>240	>240	>240	>240	>240

TABLEAU 2

Année	Jour d' ouverture		Traitement					
			Témoin	1186	PF	PF+1186	P19	P19+1186
1986	34	pH	103	89	120	79		
		temp	65	83	79	58		
1987	60	pH	79	120	>168	>168	>168	120
		temp	38	62	>168	>168	132	67

1 Le tableau 3 donne un résumé des essais  
 effectués de 1986 à 1988. Il indique les nombres d'heures  
 de stabilité augmentée ou diminuée (-) par rapport à  
 l'échantillon témoin qui ne contenait pas d'organisme  
 5 d'inoculation.

TABLEAU 3

10	Jour d' Année ouverture		Traitement					
			<u>1186</u>	<u>P-9</u>	<u>1186+P-9</u>	<u>P8</u>	<u>P-8+1186</u>	
	1986	34	pH temp	-14 -2				
15	1987	60	pH temp	41 24	>89 >130	65 44	89 111	59 44
	1988	35	pH temp	-17 -7	12 10	0 5	7 0	-2 5
20		95	pH temp	2 8	12 4	48 14	0 -8	5 -20
		140*	pH temp	0 0	-60 0	0 0	0 0	0 0
	Moyenne pour 30 - 95 jours							
25			pH temp	2.5 5.8	37.7 48.0	37.7 21.0	24 20	9.5 7.2

\* la stabilité du pH et de la température de l'échantillon  
 témoin a dépassé 240 heures. Tous les produits traités  
 30 avaient une stabilité de plus de 240 heures (10 jours)  
 pour la température et de 180 heures (7,5 jours) pour  
 le pH.

1           On ne sait pas exactement quelle est la cause  
de l'efficacité de la combinaison, propre à la présente  
invention, de souches particulières mélangées de  
5           Lactobacillus et de P.jensenii mais on suppose que ce  
résultat est dû à la production d'acide acétique et  
d'acide propionique en quantité suffisante pour retarder  
le développement des levures et des autres microflores  
nuisibles pendant le processus de détérioration aérobie.  
On admet également que l'inventeur a découvert que  
10           certaines espèces de Propionibacterium jensenii, qui sont  
plus tolérantes à des teneurs élevées en acide lactique  
et à un pH de 3,8 - 4,5 qui est inférieur au milieu  
ambiant à 5,0, sont normalement associées à l'activité de  
Propionibacteria. Dans certains cas, les produits ensilés  
15           qui avaient été inoculés avec ces Propionibacteria  
présentaient également une plus faible teneur en levure  
au moment de l'ouverture des silos, ce qui permet de  
supposer que les levures ont vu leur croissance inhibée  
pendant le processus d'ensilage. Ces exemples démontrent  
20           que cet effet est caractéristique d'une espèce et que  
toutes les espèces ou souches de cette espèce ne  
présentent pas une efficacité identique. L'espèce  
P. jensenii est la plus efficace et les couches P-9 et  
P-Fargo sont les meilleures.

25           Comme déjà indiqué, l'inoculant peut être le  
P. Jensenii isolément pour assurer son effet de  
conservation dans un milieu aérobie, ou bien celui-ci  
peut être combiné avec un organisme de conservation  
anaérobie.

## 1 R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé de conservation de produits ensilés  
comprenant le traitement du produit ensilé avec une  
5 quantité faible mais efficace d'agent de conservation  
du produit ensilé constitué du micro-organisme  
Propionibacterium jensenii ou de l'équivalent génétique  
de celui-ci.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel  
10 le Propionibacterium jensenii est choisi dans le groupe  
constitué des souches de P. jensenii P-9 et P-Fargo ou  
de leurs équivalents génétiques.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel  
la quantité d'organismes viables par tonne de produit  
15 ensilé est comprise dans la gamme de  $10^8$  à  $10^{14}$  organismes  
par tonne.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel  
la quantité d'organismes viables par tonne de produit  
ensilé est comprise dans la gamme de  $10^{10}$  à  $10^{12}$   
20 organismes par tonne.

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel  
la quantité d'organismes viables est d'environ  $10^{11}$   
organismes par tonne.

6. Procédé selon la revendication 1 comprenant  
25 un traitement par un organisme produisant de l'acide  
lactique.

7. Procédé selon la revendication 1, comprenant  
le traitement par un organisme Lactobacillus.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel  
30 l'organisme Lactobacillus est le Lactobacillus plantarum,  
ATCC 53187 ou l'équivalent génétique de celui-ci.

9. Agent de conservation de produits ensilés  
comprenant en combinaison une quantité faible mais  
efficace d'agent de conservation de produit ensilé, agent  
35 constitué de micro-organisme P. jensenii ou des

- 1 équivalents génétiques de celui -ci en combinaison avec une quantité faible mais efficace d'agent de conservation de produits ensilés constitué d'organismes Lactobacillus.
10. Composition selon la revendication 9
- 5 comprenant un support de culture approprié.



Office européen  
des brevets

### RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BE 9000346  
BO 2267

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 071 858 (MILES LABORATORIES INC.) * Revendications 1,2,5,6,8,9; page 6, lignes 26-30 *	1,6,7,9,10	A 23 K 3/00
Y	---	8	
D,Y	US-A-4 842 871 (J.E. HILL) * Revendication 1 *	8	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 9, 31 août 1981, page 583, résumé no. 78465m, Columbus, Ohio, US; PL-A-105 177 (AKADEMIA ROLNICZA, WARSZAWA) 31-12-1979 * Résumé *	1	
A	CA-A-1 218 894 (J.W. AYRES et al.) * Page 7, lignes 5-12; page 18, lignes 19-29 *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 23 K A 23 B A 23 L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12-10-1990		DEKEIREL M.J.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul		I : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie.		E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		.....	
		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 9000346  
BO 2267

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/10/90  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0071858	16-02-83	AU-A- 8690782 JP-A- 58036349	10-02-83 03-03-83
US-A- 4842871	27-06-89	Aucun	
CA-A- 1218894	10-03-87	Aucun	