



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124662** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A01N 3/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 06346	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(22) Дата подання заявки:	24.11.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	EP 0408220 A2, 16.01.1991 US 4820531 A, 11.04.1989 BRURBERG M.B. et al. Expression of a chitinase gene from <i>Serratia marcescens</i> in <i>Lactococcus lactis</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i> . Appl microbiol biotechno, 1994. - Vol. 42. - P. 108-115 OLSTORPE M. et al. <i>Pichia anomala</i> yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. Animal feed science and technology, Elsevier, Amsterdam, NL, 2010. - Vol. 156. - no. 1-2. - P. 47-56 PETERSSON S. et al. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by <i>Pichia anomala</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , d3 and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Applied and environmental microbiology, American society for microbiology, US, 1995. - Vol. 61. - no. 3. - P. 1027-1032 ZAHIRODDINI H. et al. Effects of microbial inoculants on the fermentation, nutrient retention, and aerobic stability of barley silage. Asian-Australasian journal of animal sciences, 2006. - Vol. 19. - no. 10. - P. 1429-1436 WEINBERG Z.G. et al. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. Fems microbiology reviews, Elsevier, Amsterdam, NL, 1996. - Vol. 19. - no. 1. - P. 53-68 OZDUVEN M.L. et al. Bakteriyal inokulantlar ve/veya enzimlerin tritikale silajlarında fermentasyon, aerobik stabilite ve in vitro kuru ve organik madde sindirilebilirliği üzerine etkileri. Kafkas universitesi veteriner fakultesi dergisi. - 2009. - P. 1300-6045 DRUVEFORS U. et al. Elcacy of the biocontrol yeast <i>Pichia anomala</i> during long-term storage of moist feed grain D9 under di erent oxygen and carbon dioxide regimens. Fems yeast research, 2002. - Vol. 2. - P. 389-394 PETERSSON S. et al. <i>Pichia anomala</i> as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight D10 conditions. Postharvest biology and technology. - 1999. - Vol. 15. - no. 2. - P. 175-184 TENGGERDY R.P. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. Journal of the science of food and agriculture, Wiley & Sons, Chichester, GB, 1991. - Vol. 55. - no. 2. - P. 215-228
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	28.10.2021		
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14194567.5		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	24.11.2014		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	28.08.2017, Бюл.№ 16		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	27.10.2021, Бюл.№ 43		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IB2015/059079, 24.11.2015		
(72) Винахідник(и):	Сінду Жульєн (FR), Дюран Енрі (FR)		
(73) Володілець (володільці):	ДАНСТАР ФЕРМЕНТ АГ, Poststrasse 30, CH-6300 Zug, Switzerland (CH)		

(54) КОНСЕРВАНТ ДЛЯ СІНА І СПОСІБ КОНСЕРВАЦІЇ СІНА**UA 124662 C2**

(57) Реферат:

Винахід належить до способу обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю або окремо, або в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення їх нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus*. Також запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його збереження, де спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

[1] Даний опис стосується консерванту для сіна. Зокрема, консерванту для сіна, призначеного для консервації сіна з високим вмістом води, і способу використання консерванту для сіна для консервації призначеного для зберігання сіна з високим вмістом

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[2] Пров'ялювання сіна до оптимального рівня вологості на полі перед пресуванням в тюки було б оптимальним для зменшення втрати сухої речовини (СР), ріст плісняви і дихання рослинних клітин під час пресування в тюки і зберігання сіна. Однак цей процес приводить до значних втрат поживних речовин через продовжуване дихання рослин, руйнування листя від механічних пошкоджень і через вилуговування під час дощу. Визнання цього факту, а також непередбачувані погодні умови примушує багатьох виробників сіна упаковувати сіно підвищеної, відносно оптимальної, вологості (20-30%), щоб звести до мінімуму ризик псування від дощу і втрати листя від механічних пошкоджень. Однак ця практика приводить до втрат, викликаних активністю дріжджів і плісняви, а іноді і бактерій, і, як результат, нагріванням сіна, і низької поживної цінності сіна до моменту його використання як корм для тварин.

[3] Одним з простих підходів є розпилення на вологе сіно під час його зберігання органічної кислоти, наприклад пропіонової. Незважаючи на те, що органічні кислоти, як правило, ефективні в запобіганні розмноженню грибів в сируватому сіні, вищі рівні нанесення, збільшене поле, витрати на обробку, а також екологічні проблеми приводять до того, що більшість виробників сіна неохоче користуються такими методами.

[4] Хоча згідно з результатами проведених досліджень, органічні кислоти, які використовуються для консервації сіна, спресованого в тюки при вмісті води, вище оптимального рівня, можуть бути потенційно замінені інокулянтами на основі бактерій (Baah et al., Asia-Aust., J. Anim. Sci., 18: 649-660, 2005), результати інших досліджень силосу і сінажу були суперечливими (Zahiroddini et al., Asia-Aust., J. 19: 10: 1429-1436, 2006, Muck, Trans. ASAE 47: 1011-1016, 2004). Існує множина даних того, що виявлена невідповідність у відповідях на інокулянти зумовлена взаємодією між організмами різних видів в окремих інокулянтах і популяціями епіфітних мікробів (бактерій, дріжджів і плісняви), які містяться в сіні до інокуляції.

[5] Було б бажано надати поліпшений консервант для сіна, зокрема для запобігання і зменшення псування сіна з високим вмістом води під час його зберігання внаслідок теплового впливу, а також для його консервації.

СУТЬ ВІНАХОДУ

[6] Дане розкриття надає спосіб збереження якості сіна з високим вмістом води під час його зберігання. Спосіб оснований на використанні консерванту для сіна, здатного запобігати і/або зменшувати псування сіна з високим вмістом води під час його зберігання внаслідок теплового впливу. Використовуваний консервант для сіна запобігає і/або зменшує нагрівання сіна з високим вмістом води настільки ж ефективно або краще, ніж органічні кислоти.

[7] В одному з аспектів запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю або окремо, або в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення їх нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pedococcus*. В іншому аспекті запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю.

[8] В іншому аспекті запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення їх нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia*.

[9] В іншому аспекті запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення

їх нагрівання кількістю бактерій роду *Pediococcus*.

[10] В іншому аспекті запропонований спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*.

[11] У наступному аспекті представлений консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю.

[12] У ще одному додатковому аспекті запропонований консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерії роду *Pediococcus*.

[13] В іншому додатковому аспекті запропонований консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia*.

[14] В іншому аспекті запропонований консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю бактерії роду *Pediococcus*.

[15] У ще одному аспекті всі вищезазначені аспекти можуть додатково містити щонайменше один фермент, який має пектин-ліазну активність, глюканазну активність або їх суміш.

[16] В іншому аспекті надається консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*.

[17] У ще одному аспекті надається сіно з високим вмістом води, що містить або тільки ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю, або в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus*. Сіно з високим вмістом води може додатково містити щонайменше один фермент, що має пектин-ліазну активність, глюканазну активність або їх суміш.

[18] В іншому аспекті надається сіно з високим вмістом води, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[19] Після наведеного у загальному вигляді опису суті винаходу, далі дається опис супровідних креслень, що ілюструють переважний варіант здійснення, де:

[20] На Фіг. 1 показана середньотижнева температура зберігання тюків сіна люцерни, оброблених дріжджами роду *Pichia* (*P. anomala*) або щонайменше одним ферментом з хітиназною активністю (фермент); в порівнянні з тюками сіна люцерни, обробленими і не обробленими пропіоновою кислотою (проп. кислота);

[21] На Фіг. 2 показана середньодобова температура під час зберігання тюків сіна люцерни, оброблених щонайменше одним ферментом з хітиназною активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* (*PichChit*) або бактерій роду *Pediococcus* (*Pedio pe*) в порівнянні з тюками сіна люцерни, обробленими і не обробленими пропіоновою кислотою (Проп);

[22] На Фіг. 3 наведена діаграма порівняння часу (в хвиликах), протягом якого під час зберігання (2012) тюки сіна знаходилися при температурі вище 40°C, для тюків люцерни, оброблених щонайменше одним ферментом з хітиназною активністю в комбінації з дріжджами роду *Pichia* (*Pichia*+Ферма) або бактеріями роду *Pediococcus* (*Pedio*+Ферма), і тюків сіна люцерни, оброблених пропіоновою кислотою (Проп. кислота) і не оброблених пропіоновою кислотою (контроль); і

[23] На Фіг. 4 наведена діаграма порівняння часу (в хвиликах), протягом якого під час зберігання (2013) тюки сіна знаходилися при температурі вище 40°C, для тюків сіна люцерни, оброблених щонайменше одним ферментом з хітиназною активністю в комбінації з дріжджами роду *Pichia* (*Pichia*+Ферма) або бактеріями роду *Pediococcus* (*Pedio*+Ферма), і тюків сіна люцерни, оброблених тільки дріжджами роду *Pichia* (*Pichia*), бактеріями роду *Pediococcus* (*Pedio*), пропіоновою кислотою (Проп. кислота) і не оброблені пропіоновою кислотою (контроль).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[24] Однією з проблем, яка виникає у випадку сіна з високим вмістом води, є його псування і гниття, що викликається спонтанним виділенням тепла. Такі нагріті тюки звичайно

мають більш блідий колір, меншу поживну цінність і більш помітну плісняву. Один з підходів полягає в розпиленні на сирувате сіно під час його зберігання органічної кислоти, такої як, наприклад, пропіонова кислота. Незважаючи на те, що органічні кислоти, як правило, ефективні в запобіганні розмноженню грибів у вологому сіні, вищі рівні нанесення, збільшене поле, витрати на обробку, а також екологічні проблеми приводять до того, що більшість виробників сіна неохоче користуються такими методами.

[25] Хоча згідно з результатами проведених досліджень, органічні кислоти, які використовуються для консервації сіна, спресованого в тюки при вмісті вологи, вище оптимального рівня, можуть бути потенційно замінені інокулянтами на основі бактерій, результати інших досліджень силосу і сінажу були суперечливими. Існує множина свідств того, що виявлена невідповідність у відповідях на інокулянти зумовлена взаємодією між організмами різних видів в окремих інокулянтах і популяціями епіфітних мікробів (бактерій, дріжджів і плісняви), що містяться в сіні до інокуляції.

[26] У самому широкому аспекті дане розкриття надає спосіб збереження якості сіна і запобігання або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи під час його зберігання внаслідок теплового впливу, причому спосіб включає обробку свіжого сіна консервантом для сіна в аеробних умовах.

[27] Консервант для сіна містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназою активністю. Несподівано було виявлено, що консервуюча дія консерванту для сіна і його здатність запобігати і/або зменшувати псування сіна з високим вмістом вологи під час його зберігання внаслідок теплового впливу ще більше посилюється у випадку комбінування щонайменше одного ферменту з хітиназою активністю з дріжджами роду *Pichia* або бактеріями роду *Pediococcus*. Коли щонайменше один фермент з хітиназою активністю об'єднаний з дріжджами роду *Pichia* або бактеріями роду *Pediococcus*, то, як видно на Фіг. 4, температура сіна з високим вмістом вологи значно зменшується в порівнянні з використанням кожного компонента комбінації окремо.

[28] Альтернативно, консервант для сіна може містити тільки дріжджі роду *Pichia* в кількості, ефективній для консервації сіна і зменшення його нагрівання.

[29] Використовуваний в даному описі термін «ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість» стосується кількості, яка є щонайменше достатньою для збереження якості сіна. Таким чином, кількість є щонайменше достатньою для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу, а також для його консервації.

[30] Використовуваний в даному описі термін «сіно» потрібно розуміти як такий, що стосується всіх форм сіна, оскільки цей термін звичайно використовується в сільському господарстві. Сіно частіше всього складається з люцерни, трави або сумішей люцерни і трави, зібраної при цільовому рівні вологи нижче 20%.

[31] Спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу, а також для його консервації включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназою активністю. Як згадувалося раніше, щонайменше один фермент з хітиназою активністю може бути об'єднаний з дріжджами роду *Pichia* або бактеріями роду *Pediococcus*.

[32] В одному з варіантів здійснення спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу, а також для його консервації включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназою активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення їх нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia*.

[33] В іншому варіанті здійснення спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу, а також для його консервації, включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназою активністю в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення їх нагрівання кількістю бактерій роду *Pediococcus*.

[34] Альтернативно, спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу, а також для його консервації включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість тільки дріжджів роду *Pichia*.

[35] Дріжджі роду *Pichia* включають, без обмеження, *Pichia anomala* sp. В одному з варіантів здійснення дріжджі роду *Pichia* можуть являти собою *Pichia anomala* sp., що мають всі відмітні характеристики штаму *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003. Зрозуміло, що мова йде про будь-який ізолят, що має відмітні ознаки штаму *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003, включаючи його субкультури і варіанти, які мають вказані відмітні ознаки і активність. Штам *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003 депонований в промисловій колекції дріжджів DBVPG в Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecniche, Sezione di Microbiologia Agroalimentare ed Ambientale, <http://www.agr.unipg.it/dbvpg>, Університет Перуджії, Італія.

[36] Бактерії роду *Pediococcus* включають, без обмеження, *Pediococcus pentosaceus* sp. У варіанті здійснення бактерії роду *Pediococcus* можуть являти собою *Pediococcus pentosaceus* sp, що мають всі відмітні ознаки штаму *Pediococcus pentosaceus* BTC328 (з номером доступу NCIMB 12674). В іншому варіанті здійснення бактерії роду *Pediococcus* можуть являти собою *Pediococcus pentosaceus* sp, які мають всі відмітні характеристики штаму *Pediococcus pentosaceus* BTC401 (з номером доступу NCIMB 12675). Зрозуміло, що мова йде про будь-який ізолят, що має відмітні характеристики штаму *Pediococcus pentosaceus* BTC328 або BTC401, включаючи їх субкультури і варіанти, які мають вказані відмітні ознаки і активність, як розкрито в даному описі. Штами *Pediococcus pentosaceus* з номерами доступу NCIMB 12674 і 12675 були депоновані в Національній колекції промислових, харчових і морських бактерій Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA.

[37] В одному з варіантів здійснення способу для обробки сіна звичайно використовується кількість від 10^5 до 10^{15} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна, переважно від 10^7 до 10^{13} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна і більш переважно від 10^9 до 10^{12} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна. Використовуваний в даному описі термін «тонна» потрібно розуміти як такий, що стосується метричної тонни (1000 кг).

[38] Щонайменше один фермент з хітиназною активністю може мати хітиназну активність в діапазоні від приблизно 6 до приблизно 300 одиниць (U) активності ферменту на тонну підлягаючого обробці сіна. В одному з варіантів здійснення хітиназна активність може знаходитися в діапазоні від приблизно 6 до приблизно 100U на тонну підлягаючого обробці сіна. Одиничне значення U визначається як кількість ферменту, що забезпечує визначену кількість хітиназної активності. Кожна одиниця (U) активності ферменту може вивільняти близько 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозаміну з хітину (г) на годину при pH=6,0 і при температурі 25°C протягом 2 годин аналізу.

[39] Консервант для сіна згідно з даним описом може додатково містити щонайменше один фермент з пектин-ліазною активністю, глюканазною активністю або їх суміш.

[40] Консервант для сіна згідно з даним описом може знаходитися або в рідкій, або в твердій формі. Консервант для сіна згідно з даним описом може містити придатний носій або може бути використаний в тому вигляді, в якому він представлений. У твердій формі консервант для сіна може містити тверді носії або фізичні наповнювачі. Придатний носій може бути в рідкій формі на основі води або в рідкій формі, що не містить воду, або в твердій формі. Необмежувальні приклади носія в рідкій формі на основі води або в рідкій формі, що не містить воду, включають воду, олії і парафін. Необмежувальні приклади носіїв в твердій формі включають органічний або неорганічний носій, такий як, наприклад, мальтодекстрин, крохмаль. Тверда форма може наноситися безпосередньо на сіно шляхом напилування легкого порошку або шляхом обприскування сіна, якщо знаходиться в рідкому носії. Зрозуміло, що для цілей даного опису може використовуватися будь-який інший придатний носій. Також зрозуміло, що консервант для сіна відповідно до даного винаходу може бути нанесений на сіно стандартними методами, що звичайно використовуються фахівцями в даній галузі техніки. Консервант для сіна також можна наносити до, під час і/або після пресування сіна в тюки. Даний винахід буде зрозумілішим з наведених нижче прикладів, які наведені для ілюстрації винаходу, а не для обмеження його об'єму.

[41] ПРИКЛАДИ

Приклад 1:

[42] Сіно, умови обробки і пресування в тюки

[43] Використовували сіно третього покосу, що складається з 90% люцерни і 10% трави. Сіно косили дисковою косою New-Holland™ 17 вересня 2011 року і залишали для сушіння не проводячи обробки і без ворущіння. Рівень вологості оцінювали за допомогою приладу для визначення рівня вологості сіна Farmex™ (1205 Danner Drive, Aurora, OH) через п'ять днів після покосу, який знаходився в діапазоні від 20 до 35%. В цей же час готували консерванти для сіна

шляхом попереднього зважування інокулянтів і змішування кожного інокулянту в окремій ємності, що містить 6,5 л попередньо виміряної дистильованої води, а потім струшували протягом 1 хвилини. Ємність розпилювача і штангу з розпилювальними насадками з одним соплом встановлювали на великий квадратний сінний прес 4790 Hesston. Шланг розміщували

таким чином, щоб розпилення покривало 90% валка з мінімальним дрейфом.

[44] Для визначення часу, необхідного для завершення нанесення добавки на один пакунок, а також для більш точного визначення рівня вологості пресованого в тюки матеріалу було виготовлено два випробувальних тюки. Рівень вологості тюка визначали, використовуючи зонд для сіна. Середній час виготовлення одного тюка (0,91 м x 1,22 м x 2,44 м) виявився таким, що дорівнює 2 хвилинам 30 секундам, а середня вага тюка становила 820 кг. Кількість, *P. anomala*, що наноситься, дорівнювала 10^{11} КУО/л на тонну сіна. Фермент з хітиназною активністю наносили в кількості 1,5 г (суспендованих в 1 л води) на тонну сіна, що відповідає приблизно 6 од. на тонну сіна. Продукт пропіонової кислоти, що складається на 68% (об./об.) з пропіонової кислоти, наносили з концентрацією 2,72 л/т і використовували як позитивний контроль. Негативним контролем служила вода, яку наносили з концентрацією 1 л на тонну сіна. *P. anomala* і фермент з хітиназною активністю були придбані в компанії Lallemand Specialities Inc. (Milwaukee, WI, USA), а пропіонова кислота була придбана в компанії Wausau Chemical Corporation (Wausau, WI, USA). Для кожного виду обробки було виготовлено по п'ять тюків. Після кожної обробки брали зразки *P. anomala* для перевірки життєздатності і визначення кількості організмів. Цю процедуру виконували для підтвердження кількості, нанесених організмів. Кожний пакунок маркували відразу ж після його виходу з преса, використовуючи аерозольну фарбу, після чого маркували за допомогою бірок, які прикріплювали пластиковими хомутиками. Всі тюки зважувалися через день після пресування в тюки і взяття зразків за допомогою свердла. Для зменшення ризику займання тюки після пресування залишали в полі на 2 тижні перед їх транспортуванням і вміщенням на зберігання в один шар у відкритому з одного боку сараї. На день 90 з тюків знов брали за допомогою свердла зразки з 4 сторін (виключаючи верхню і нижню частини тюків), і перекладали їх вгору (стопа з двох тюків). На день 180 знов брали зразки за допомогою свердла.

[45] Визначення хімічних і мікробіологічних показників

[46] Виконували хімічний і мікробіологічний аналізи зразків сіна, взятих з шести різних ділянок поля, і композитних зразків, отриманих за допомогою свердла, з чотирьох різних місць кожного тюка в дні зберігання 1, 90 і 180. Для підрахунку загальної кількості бактерій, бактерій, які продукують молочну кислоту (МКБ), дріжджів і плісняви використовували процедури, описані у McAllister et al. (1995 Intake, digestibility and aerobic stability of barley silage inoculated with mixtures of Lactobacillus plantarum and Enterococcus faecium. Can. J. Anim. Sci. 75:425-432). Суху речовину (СР), органічну речовину (ОР) і сирий протеїн (СП) визначали згідно з процедурами АОАС (1990), а нейтральне детергентне волокно (НДВ), кислотне детергентне волокно (КДВ) і кислотний детергентний нерозчинний азот (КДНА) визначали методами, описаними в Van Soest et al. (1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597).

[47]

Таблиця 1

Хімічний склад (СР, %), рН і мікробіологічний склад (КУО, $\log_{10}$) сіна через 90 днів після обробки різними консервантами для сіна під час пресування в тюки.¹

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

¹РА=Pichia anomala; СЕ=Фермент з хітиназною активністю; ВРА=Пропіонова кислота; CON=Контроль

²ТВ=бактерії, які ростуть на поживному агарі без складних поживних потреб; LAB=бактерії, які ростуть на MRS, ймовірно Lactobacilli; ОР=органічна речовина; NH₃=аміачний азот; ОА=загальний азот; МК=Молочна кислота; КДВ=кислотне детергентне волокно; КДНА=кислотний детергентний нерозчинний азот

[48] У таблиці 1 показаний вплив обробки консервантами для сіна на хімічні і мікробіологічні профілі зразків сіна, зібраних в день 0 (день пресування в тюки) і через 90 днів після пресування в тюки. Крім молочної кислоти і кислотного детергентного нерозчинного азоту (КДНА), різні види обробки не чинили впливу ні на один з оцінюваних факторів, тобто на рН, загальний азот, аміачний азот і КДВ. Концентрація молочної кислоти була нижчою при обробці *P. anomala* в порівнянні з іншими видами обробки. У порівнянні з іншими видами обробки рівень КДНА (% СР) був вищим при обробці *P. anomala*. У зразках сіна, отриманих через 90 днів, обробка не чинила ніякого впливу на популяції всіх бактерій (бактерій, які ростуть на поживному агарі без складних поживних потреб), дріжджів і плісняви. У порівнянні з іншими видами обробки популяції молочнокислих бактерій були більш численними в тюках, оброблених *P. anomala* і в контролі, кількість яких збільшилася з log₁₀ 3,80 КУО/г в день пресування до log₁₀ 5,42 і log₁₀ 6,29 КУО/г, відповідно в день 90.

[49]

Таблиця 2

Хімічний склад (% СР), рН і мікробіологічний склад (КУО log₁₀) сіна через 180 днів після обробки різними консервантами для сіна при пресуванні в тюки.¹

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

¹РА=Pichia anomala; СЕ=Фермент з хітиназною активністю; ВРА=Пропіонової кислота; CON=Контроль

²ТВ=бактерії, які ростуть на поживному агарі без складних поживних потреб; LAB=бактерія, які ростуть на MRS, ймовірно Lactobacilli; ОР=органічна речовина; NH₃=аміачний азот; ОА=загальний азот; МК=Молочна кислота; КДВ=кислотне детергентне волокно; КДНА=кислотний детергентний нерозчинний азот

[50] У хімічному і мікробіологічному складах зразків, отриманих через 180 днів, не спостерігалось ніяких відмінностей між видами обробки, крім величини рН і популяції дріжджів (див. Таблицю 2). У порівнянні з всіма іншими видами обробки величина рН була самою низькою у *P. anomala* (6,00). Популяція дріжджів була самою численною у випадку обробки ферментами з хітиназною активністю.

[51]

Таблиця 3

Концентрації летючих жирних кислот (ЛЖК) в зразках сіна, отриманих за допомогою свердла, через 90 і 180 днів після обробки різними добавками при пресуванні в тюки¹

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

¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=фермент з хітиназною активністю; ВРА=Пропіонова кислота; CON=Контроль

[52] З Таблиці 3 видно, що загальна концентрація ЛЖК (летючих жирних кислот) і концентрація ацетату в зразках, отриманих через 90 і 180 днів, не змінилася після обробки. Переважаючим серед ЛЖК, отриманих через 180 днів зберігання, був ацетат, частка якого становила від 94% до 98% від загальної кількості ЛЖК, отриманих в тюках. Через 180 днів зберігання спостерігалася тенденція до збільшення кількості ацетату і загальної кількості ЛЖК в тюках, оброблених *P. anomala* і ферментами з хітиназною активністю. Концентрація ацетату і загальна концентрація ЛЖК в тюках через 180 днів обробки *P. anomala* і ферментами з хітиназною активністю виявилася щонайменше на 14% вищою, ніж у випадку інших видів обробки, що вказує на те, що обидві ці обробки індукували в тюках вищий ступінь анаеробного мікробного бродіння в порівнянні з іншими видами обробки. У порівнянні з контрольною обробкою, загальна концентрація ЛЖК і концентрація ацетату в тюках через 180 днів обробки *P. Anomala* в комбінації з ферментами з хітиназною активністю були вищими приблизно на 32%. Як і очікувалося, концентрація пропіонату в тюках, оброблених пропіоновою кислотою, була відповідно вищою через 90 і 180 днів в зразках інших видів обробки (див. таблицю 3).

[53]

Таблиця 4

Оцінка якості сіна, обробленого різними добавками, після 180 днів зберігання

Фактор якості	Тюк, №	РА	СЕ	ВРА	CON
КОЛІР	1	5	18	10	17
	2	17	18	5	5
	3	17	10	12	5
	4	5	-	10	10
	5	17	0	7	15
	Середнє	12,2	15,3	8,8	10,4
ЗАПАХ	1	2	12	12	12
	2	10	15	0	0
	3	7	5	12	0
	4	10	0	5	0
	5	17	0	5	12
	Середнє	11,2	10,7	6,8	4,8
ЗАГАЛЬНИЙ СТАН	1	7	30	22	29
	2	27	33	5	5
	3	34	15	24	5
	4	15	0	15	10
	5	34	0	12	27
	Середнє	23,5	26	15,6	15,2

Продовження таблиці 4

ОЦІНКА	1	P	G	P	A
	2	VP	G	VP	VP
	3	G	P	P	VP
	4	G	-	VP	VP
	5	G	-	P	P

PA=*Pichia anomala*; CE=фермент з хітиназною активністю; BPA=Пропіонова кислота; CON=Контроль

Колір/запах визначені на основі Інформаційного бюлетеня № 644, що випускається службою пропаганди знань при університеті штату Меріленд (Maryland Cooperative Extension Fact Sheet),

«Оцінка якості сіна»

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

Колір

Сіно яскраво-зеленого кольору (15-20).

Сіно від золотисто-жовтого до жовтого кольору - від 5 до 15 балів

Сіно від коричневого до чорного кольору - від 0 до 5 балів.

Запах

Запах свіжоскошеного сіна має самий високий бал (від 15 до 20 балів).

Сіно із затхлим або іншим запахом отримує від 5 до 15 балів.

Сіно з пліснявим або незвичайним запахом пилу має дуже низькі бали (від 0 до 5 балів)

Оцінка

Оцінка основана на загальній оцінці експерта, яка мала наступні градації: дуже погане (VP), погане (P), середнє (A), хороше (G), дуже хороше (VG) і відмінне (E).

[54] Всі тюки розкривали через 180 днів, і їх якість оцінювали на основі Інформаційного бюлетеня № 644, який випускається службою пропаганди знань при університеті штату Меріленд (Maryland Cooperative Extension Fact Sheet). Виходячи з візуальної і сенсорної оцінки, сіно найгіршої якості виявилось в контролі і у випадку обробки пропіоновою кислотою, сіно, оброблене іншими способами, було середньої і хорошої якості (таблиця 4).

[55] Термостійкість

[56] Термостійкість тюків контролювали шляхом постійного вимірювання температури всередині кожного тюка за допомогою трьох контактних кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), які були вставлені в отвори, зроблені за допомогою свердла, на наступний ранок після пресування. Контактні кнопки були виконані з можливістю запису температури кожної години протягом перших 60 днів терміну зберігання. Оскільки результати вимірювання температури не виявили подальшого нагрівання, зонди не були вміщені назад в тюки через 60 днів. Тюки відкривали і проводили візуальну оцінку псування і наявності плісняви в кінці періоду зберігання (180 днів) на основі Інформаційного бюлетеня № 644, що випускається службою пропаганди знань при університеті штату Меріленд (Maryland Cooperative Extension Fact Sheet) (<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

[57] Як показано на Фіг. 1, середня тижнева температура навколишнього середовища (зона зберігання тюків) знижувалася з максимальної, яка дорівнювала приблизно 16°C протягом першого тижня зберігання, до мінусових температур після 7 тижня. Проте, протягом перших трьох тижнів періоду зберігання температура у всіх купах залишалася вищою 20°C. Найвища тижнева температура (приблизно 34°C) була зареєстрована на другому тижні в контрольних тюках. Середня температура в контрольних тюках протягом перших трьох тижнів становила приблизно 30°C. Температура в тюках, оброблених ферментами з хітиназною активністю послідовно знижувалася в порівнянні з контрольними тюками з 1 по 7 тиждень (Фіг. 1). Аналогічна тенденція (за винятком другого тижня) спостерігалася при порівнянні з обробкою пропіоновою кислотою (Фіг. 2). Хоча всі види обробки вплинули позитивним чином на пониження температури в тюках під час зберігання, найбільш ефективною обробкою, в порівнянні з контролем і обробкою пропіоновою кислотою, виявилася обробка ферментами з хітиназною активністю. У порівнянні з контрольними тюками і тюками, обробленими пропіоновою кислотою, середня температура в тюках, оброблених ферментами з хітиназною активністю, була на 6-8°C і 4-5°C нижчою температури в контрольних тюках і тюках, оброблених пропіоновою кислотою, протягом одного і того ж періоду часу.

[58] Експеримент за участі тварин

[59] Швидкість *in situ* і ступінь зникнення СР і НДВ в зразках сіна через 180 днів визначали за участі трьох корів з встановленою на рубець канюлею, яких перед цим годували стандартним для загону кормом, що складається з 50% тимोфіївки і 50% ячмінного силосу (основа СР). Додаткові зразки, взяті із зразків сіна через 180 днів, отриманих з тюків, оброблених тим же самим консервантом, збирали і подрібнювали, пропускаючи через 4 мм сито. Приблизно 4 г кожного композитного зразка зважували в мішках Dacron й інкубували в трьох повторях в кожній корові протягом 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 і 120 годин. Мішки були виготовлені з моноволоконистої поліефірної сітки (розмір пор 53 мкм, 5 см x 20 см, Ankom, Fairport, New York). Протягом двох тижнів до початку інкубації корови отримували цей корм для адаптації до цього корму. Відразу після інкубації мішки промивали холодною водопровідною водою до повного видалення вмісту рубця із зовнішньої сторони мішків. Мішки прали в побутовій пральній машині в холодній воді протягом трьох хвилин, використовуючи цикл делікатного прання без мийного засобу і віджимання. Процедуру прання виконували один раз. Дубльовані набори неінкубованих сумок, що містять зразки кожної обробки, промивали з вказаними вище мішками і використовували для оцінки 0 год зникнення для кожної обробки. Потім всі мішки сушили в печі з повітряною конвекцією при 55°C протягом 48 годин. Перед проведенням аналізу на вміст НДВ згідно з описаними вище методами, залишки з трьох мішків з однаковою обробкою, інкубованих в одній корові, об'єднували і подрібнювали, пропускаючи через 1 мм сито. Виражене в процентах зникнення СР і НДВ розраховували, виходячи з вмісту, того, що залишився в мішках після кожного часу інкубації. Дані про зникнення СР і НДВ адаптували до модифікованої версії експонентної моделі Орскова і Макдональда (Orskov and McDonald (1979)) з лаг-фазою:

[60] $p = a + b(1 - e^{-c(t-lag)})$ для $t > lag$

[61] де p - зникнення СР або НДВ (%) через t годин, a - швидко зникаюча фракція (%), b - повільно зникаюча фракція (%), c - швидкість зникнення (год⁻¹) фракції b . Параметри оцінювали за допомогою ітеративної нелінійної процедури (метод Маркардта (Marquardt)), використовуючи пакет програмного забезпечення SAS (1990). Ефективне зникнення (EFFD, %) через 48 годин інкубації оцінювали, виходячи з передбачуваної 6% частки виходу фракції.

[62]

Таблица 5

Вплив консерванту для сіна¹ на зникнення *in situ* СР (%)² сіна, що складається з люцерни і стоколосу, інкубованого в рубці корів Джерсі (Jersey).

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

[63] ¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=фермент з хітиназною активністю; ВРА=пропіонова кислота; CON=контроль

[64] ²Середнє значення в одному рядку з різними надрядковими індексами відрізняються ($P < 0,05$).

[65] ³Параметри, розраховані за рівнянням: $p = a + b[1 - e^{-c(t-lag)}]$ для $t > lag$; де p - частка (%) НДВ, що зникає з нейлонових мішків через t годин інкубації; a - швидко зникаюча фракція (%); b - повільно зникаюча фракція (%); c - швидкість зникнення (год⁻¹) фракції b .

[66] Зникнення сухої речовини в сумці

[67] Вплив консервантів на зникнення СР через 12, 24 і 48 год, включаючи кінетику зникнення, наведений в таблиці 5. Зникнення СР відбувалося без лаг-періоду. Зразки сіна, оброблені мікробною добавкою (*P. anomala*), мали вищу швидкість зникнення СР у всіх часових точках інкубації (12, 24 і 48 год) в порівнянні з контролем і обробкою пропіоновою кислотою; за

винятком 48 годин, коли всі добавки (включаючи ферменти з хітиназною активністю і пропіонову кислоту) були вищими, ніж в контролі. Аналогічно, і швидкість, і ефективність зникнення СР були вищі в зразках сіна, оброблених мікробними добавками, в порівнянні з контролем і обробкою пропіоновою кислотою. У порівнянні з всіма іншими видами обробки зразки сіна з тюків, оброблених *P. anomala*, мали найвищу швидкість зникнення СР (0,114 год⁻¹). Найнижча швидкість 0,083 год⁻¹ і 0,087 год⁻¹ спостерігалася у випадку обробки пропіоновою кислотою і в контролі. Всі добавки збільшували потенційно переварювану фракцію СР, за винятком ферментів з хітиназною активністю, в якій вона була аналогічною фракції в контролі. Проте ефективне зникнення СР в зразку, обробленому *P. anomala*, було вищим, ніж в контролі і при обробці пропіоновою кислотою.

[68]

Таблиця 6

Вплив консервантів¹ для сіна на зникнення in situ НДВ (%)² сіна, що складається з люцерни і стоколосу, інкубованого в рубці корів Джерсі (Jersey).

Зникнення ³	РА	СЕ	ВРА	CON
12год	41,06 ^b	37,28 ^c	39,04 ^{bc}	39,64 ^{bc}
24год	51,88 ^{ab}	49,22 ^b	51,88 ^{ab}	51,11 ^b
48год	58,23 ^b	56,07 ^c	60,19 ^{ab}	58,38 ^{ab}
Кінетичні показники				
a	19,28	19,90	19,11	18,80
b	40,48	37,67	43,59	41,54
c, год ⁻¹	0,078	0,076	0,069	0,070
лаг період	1,89 ^b	3,67 ^a	2,87 ^{ab}	1,91 ^b
Потенційний	59,76 ^{bc}	57,57 ^c	62,70 ^a	60,34 ^b
Ефективний	39,87 ^b	36,66 ^b	38,84 ^b	38,94 ^b

[69] ¹РА=*Pichia anomala*; СЕ=фермент з хітиназною активністю; ВРА=пропіонова кислота; CON=Контроль

[70] ²Середнє значення в одному рядку з різними надрядковими індексами відрізняються (P<0,05).

[71] ³Параметри, розраховані за рівнянням: $p = a + b[1 - e^{-c(t-lag)}]$ для $t > lag$; де p - частка (%) НДВ, що зникає з нейлонових мішків через t годин інкубації; a - швидко зникаюча фракція (%); b - повільно зникаюча фракція (%); c - швидкість зникнення (год⁻¹) фракції b.

[72] Незважаючи на відсутність відмінностей між обробками з точки зору швидкості зникнення НДВ, швидко зникаючої фракції і повільно зникаючої фракції, самим ефективним було зникнення в сіні, обробленому *P. anomala*, в порівнянні з всіма іншими видами обробки (таблиця 6). Самий тривалий лаг період в зникненні НДВ спостерігали в сіні, обробленому ферментами з хітиназною активністю (3,67 год), а найкороткий лаг період 1,89 год спостерігали у випадку обробки *P. anomala*. Однак останній лаг період не відрізнявся від лаг періоду для інших видів обробки. Загальний показник зникнення НДВ через 12, 24 і 48 год знаходився в межах від 37,28% (найнижче значення) в сіні, обробленому ферментами з хітиназною активністю, до 41,06% (найвище значення) в сіні, обробленому *P. anomala*, при цьому сіно, оброблене іншими методами, мало проміжні значення. Аналогічна тенденція спостерігалася і для 24 год зникнення. Зникнення НДВ через 48 годин було найнижчим у випадку обробки ферментами з хітиназною активністю в порівнянні з всіма іншими видами обробки.

[73] Дані зі зникнення СР з мішків свідчать про те, що *P. anomala* збільшує потенційно переварювану фракцію, а також швидкість і ефективність зникнення цієї фракції сіна в порівнянні з контролем. Фактично, значення ефективного зникнення в сіні, обробленому *P. anomala*, були вищі, ніж в контролі і при обробці пропіоновою кислотою.

[74] Приклад 2:

[75] Сіно, умови обробки і пресування в тюки

[76] Сіно являло собою сіно люцерни і було зібране 15 серпня 2012 року в Форт-Маклеод, Альберта, Канада. Сіно люцерни сушили в полі до рівня вологості від приблизно 24% до приблизно 30%. Вологість тюка визначали згідно з тим, як описано в прикладі 1.

[77] Кількість комбінації *P. anomala*, яка наноситься, з ферментом з хітиназною активністю

становила відповідно 10^{11} КУО і 1,5 г на 1 л води на тонну сіна. Відповідно, кількість, комбінації *P. pentosaceus*, яка наноситься, в комбінації з ферментом, що має хітиназну активність, становила 10^{11} КУО і 1,5 г на 1 л води на тонну сіна. Продукт пропіонової кислоти, що становить з 68% (об./об.) пропіонової кислоти, наносили з концентрацією 2,72 л/т і розглядали як позитивний контроль. Негативним контролем була вода, яку наносили з концентрацією 1 л на тонну сіна. Для кожного виду обробки в той же день виготовляли п'ять великих круглих тюків вагою приблизно 800 кг відповідно до прикладу 1. Зразки, отримані з тюків за допомогою свердла, збирали для кожного виду обробки в дні 0, 90 і 180 після пресування в тюки для оцінки їх харчової цінності, продукту ферментації і мікробних змін.

[78] Отримані за допомогою свердла зразки, зібрані в дні 0 і 90, 180 після пресування в тюки, були піддані мікробіологічному і хімічному аналізу. Мікробіологічний аналіз проводили з метою визначення кількості, виділення і характеристик мікроорганізмів (загальної кількості бактерій, дріжджів і плісняви) на відповідних планшетах методом серійного розведення.

[79]

Таблиця 7

Кількість мікробів в сіні люцерни, обробленої різними консервантами для сіна при пресуванні в тюки

Обробка	Дні	Контроль	<i>Pichia+</i> ферменти	<i>Pedio+</i> ферменти	Пропіонова кислота
Загальна кількість бактерій, log КУО/г DM	0	5,92	5,28	6,22	6,34
	90	7,79 ^{ab}	7,34 ^{bc}	6,69 ^c	8,49 ^a
	180	8,27 ^a	6,25 ^b	6,08 ^b	8,25 ^a
ДРІЖДЖІ	0	4,94	4,98	5,86	5,49
	90	6,57	4,70	5,05	6,22
	180	5,13	4,69	4,40	4,89
ПЛІСНЯВА	0	4,83	4,79	4,99	4,66
	90	5,89	5,81	5,85	5,91
	180	6,49 ^a	6,92 ^a	6,69 ^a	5,36 ^b

[80] Під час пресування в тюки мікробіологічний профіль сіна після кожної обробки залишався аналогічним відносно загальної кількості бактерій, дріжджів і плісняви, навіть у випадку реєстрації кількісних відмінностей. Через 90 днів після пресування тюків загальна кількість бактерій при обробці ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pediococcus pentosaceus*, зменшилась в порівнянні з контролем і обробкою пропіоновою кислотою, тоді як обробка ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* привела до зменшення кількості бактерій. Було відмічене відновлення чисельності дріжджів в двох видах обробки ферментами з хітиназною активністю, як в комбінації з *Pichia anomala*, так і в комбінації з *Pediococcus pentosaceus*, на відміну від контролю і обробки пропіоновою кислотою. Обробка зразків не вплинула ніяким чином на кількість плісняви, крім зразків, отриманих через 180 днів, в яких кількість плісняви зменшилась у випадку обробки пропіоновою кислотою.

[81] Проводили хімічні аналізи для визначення величини рН, ЧВ, загального азоту, аміачного азоту, НДВ, КДВ, кислотного детергентного нерозчинного азоту (КДНА), водорозчинних вуглеців, летючих жирних кислот (ЛЖК) і молочної кислоти (МК).

[82]

Таблиця 8

Хімічний склад сіна люцерни в дні 0, 90 і 180 після обробки консервантом для сіна при пресуванні в тюки

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

[83] ферменти з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus* з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*, ферменти з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*.
[84]

Таблиця 9

Продукт ферментації сіна люцерни, обробленої різними консервантами для сіна при пресуванні в тюки

Обробка	Дні	Контроль	Pichia+ ферменти	Pedio+ ферменти	Пропіонова кислота
рН	0	6,16 ^b	6,23 ^a	6,23 ^a	6,07 ^c
	90	7,64 ^a	5,92 ^b	5,87 ^b	8,29 ^a
	180	7,40 ^{ab}	6,15 ^c	6,03 ^c	7,80 ^a
МК г/кг СР	90	0,32	0,26	0,17	0,49
	180	0,26	0,11	0,10	0,17
бурштинова кислота	90	0,26	0,25	0,24	0,20
	180	0,23	0,23	0,24	0,28
оцтова кислота	90	0,04	0,31	0,29	0,42
	180	0,29	0,29	0,63	0,71
пропіонова кислота	90	NA	NA	NA	0,08
	180	NA	NA	NA	0,04
Загальна кількість ЛЖК	90	0,04	0,31	0,33	0,50
	180	0,29	0,29	0,66	0,76

[85] На процес ферментації сіна сильно не вплинула обробка ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*, оскільки цей кормовий матеріал не схильний до ферментації. Однак нижчий рН, що спостерігається через 90 днів у випадку обробки ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*.

[86] Отримані за допомогою свердла зразки сіна збирали в день 180 і оцінювали його поживну цінність методами *in situ* і *in vitro*.

[87] Проводили експерименти *in situ* для оцінки впливу консервантів для сіна на швидкість і ступінь переварювання зразків сіна, зібраних через 180 днів після пресування тюків. Для цього

- використовували трьох корів з встановленою на рубець канюлею, яких перед цим годували стандартним для загону кормом. Приблизно 4 г кожного композитного зразка з кожного тюка (з повтором) на кожну обробку зважували в мішках Dasgon і інкубували в трьох повторах в кожній корові протягом 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 і 120 годин. Мішки витягували після інкубації і обробляли згідно з LRC SOP для визначення *in situ* зникнення CP і НДВ.
- 5 [88]

Таблиця 11

Параметри *in situ* для сіна люцерни, обробленої консервантами для сіна при пресуванні тюків.

Обробка	Контроль	Pichia+ферменти	Pedio+ферменти	Пропіонова кислота
a	26,61 ^{bc}	30,05 ^{ab}	33,79 ^a	23,64 ^c
b	46,80 ^{ab}	43,08 ^{bc}	39,67 ^c	51,69 ^a
c	0,05 ^c	0,06 ^{bc}	0,07 ^{ab}	0,04 ^c
лаг період	1,80 ^{bc}	3,90 ^{abc}	4,30 ^{abc}	1,70 ^c
a+b	73,4	73,1	73,5	75,3

a=швидко переварювана фракція
b=повільно переварювана фракція
c=швидкість переварювання і (/год)
lag=лаг період (год)

- [89] Дані *in situ*, наведені в таблиці 11, показують, що сіно, оброблене ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*.
- 10 [90] Також проводили експеримент *in vitro* для оцінки впливу мікробних інокулянтів на утворення газу і кінетичні характеристики зразків сіна через 180 днів. Виконували два тести змішаної рідини з рубця трьох корів з встановленою на рубець канюлею, яких перед цим годували стандартним для загону кормом. Для кожної обробки у флаконах зважували приблизно 0,5 г кожного композитного зразка сіна, отриманого через 180 днів зберігання, й інкубування в трьох повторах для кожного тесту, а газ вимірювали через 3, 6, 9, 12, 24 і 48 годин. Флакони витягували після інкубації і обробляли згідно з LRC SOP для визначення *in vitro* зникнення CP, утворення газу, аміаку і ЛЖК.
- 15 [91]

20

Таблиця 12

In vitro переварюваність сіна люцерни, обробленого консервантами для сіна при пресуванні в тюки

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

a=асимптотичне утворення газу (мл/г CP)
c=швидкість ферментації фракції, швидкість утворення кількості газу (мл/год)
lag=лаг період (год)

- [92] *In vitro* переварюваність і ферментованість сіна через 180 днів підтвердили *in situ* результати підвищеної засвоюваності для обох видів обробки сіна ферментами з хітиназною активністю в комбінації як з *Pichia anomala*, так і *Pediococcus pentosaceus*.
- 25 [93] Термостійкість
- [94] Температуру кожного тюка контролювали шляхом безперервного вимірювання внутрішньої температури протягом всього періоду зберігання за допомогою трьох (3) контактних

кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), введених у внутрішню частину кожного тюка відразу ж після збору урожаю (показано на кресленнях). Температуру реєстрували з інтервалом 4 години протягом 10 тижнів.

[95] Як показано на фіг. 2, обробка ферментами з хітиназною активністю в комбінації як з *Pichia anomala*, так і з *Pediococcus pentosaceus* мала знижену середню температуру протягом 60 днів після пресування в тюки. При обробці пропіоновою кислотою середня температура у всіх часових точках була найвищою.

[96] Значущість цього ефекту добре видна на Фіг. 3. На Фіг. 3 показано наскільки довго температура була вищою 40°C при кожному виді обробки. Оскільки ця температура загально визнана як порогова для пошкоджень, показником яких є рівень КДНА, вона показує інтенсивність внутрішньої температури тюків сіна. Для обробки пропіоновою кислотою період, при якому температура залишалася вищою 40°C, виявився самим тривалим. У випадку обробки ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pediococcus pentosaceus* час знаходження при температурі вище 40°C був самим коротким, за яким слідував час для обробки ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala*, причому для обох видів обробки, що проводяться ферментами з хітиназною активністю в комбінації з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*, час знаходження при температурі вище 40°C був коротшим, ніж в контролі.

[97] На закінчення потрібно зазначити, що комбінація ферментів з хітиназною активністю з *Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus* знижувала внутрішню температуру тюків сіна, величину рН і загальну кількість бактерій в порівнянні з контролем і обробкою пропіоновою кислотою під час зберігання. Ці види обробки також привели до збільшення *in situ* зникнення сухої речовини (DMD) і швидкості розщеплення, а також *in vitro* DMD і швидкості газоутворення. Це можна пояснити зниженим вмістом НДВ і КДВ у випадку цих двох обробок.

[98] Приклад 3

[99] Цей приклад показує, що консервуючу дію ферменту з хітиназною активністю і його здатність запобігати і/або зменшувати псування сіна з високим вмістом вологи в результаті теплового впливу ще більше посилюється, якщо щонайменше один фермент з хітиназною активністю об'єднаний з дріжджами роду *Pichia* або бактеріями роду *Pediococcus*. Сіно було збирали і сушили в полі до рівня вологості, як описано в прикладі 2.

[100] Кількість комбінації *P. anomala*, що наноситься, з ферментом з хітиназною активністю становила відповідно 10¹¹ КУО і 1,5 г на 1 л води на тонну сіна. Відповідно, кількість, комбінації *P. pentosaceus*, що наноситься, в комбінації з ферментом з хітиназною активністю становила 10¹¹ КУО і 1,5 г на 1 л води на тонну сіна. Кількість тільки *P. anomala*, що наноситься, дорівнювала 10¹¹ КУО в 1 л на тонну сіна. Кількість тільки *P. anomala*, що наноситься, дорівнювала 10¹¹ КУО в 1 л на тонну сіна. Фермент з хітиназною активністю наносили кількості 1,5 г (суспендованої в 1 л води) на тонну сіна. Продукт пропіонової кислоти, який складається з 68% (об./об.) пропіонової кислоти, наносили з концентрацією 2,72 л/т і розглядали як позитивний контроль. Негативним контролем була вода, яку наносили з концентрацією 1 л на тонну сіна. Для кожного виду обробки в той же день виготовляли п'ять великих круглих тюків вагою приблизно 800 кг відповідно до прикладу 1.

[101] Як і в прикладі 2, температуру кожного тюка контролювали шляхом безперервного вимірювання внутрішньої температури протягом всього періоду зберігання за допомогою трьох (3) контактних кнопок Dallas Thermochron (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY), введених у внутрішню частину кожного тюка відразу після збору урожаю (показано на кресленнях). Температуру реєстрували з інтервалом 4 години протягом 10 тижнів. Як показано на фіг. 4, коли щонайменше один фермент з хітиназною активністю об'єднують з *P. anomala* або *P. pentosaceus*, то внаслідок такого комбінування зниження температури сіна з високим вмістом вологи несподівано значуще збільшується в порівнянні з використанням кожного компонента окремо.

[102] Приклад 4

[103] Задача випробування

[104] Це випробування розширює набір доказів на користь концепції добавки для сіна, яка зменшила б нагрівання тюків, виготовлених в складних умовах прибирання (вміст вологи, вище оптимального рівня). Воно відповідало аналогічному випробуванню, що проводиться в масштабі лабораторії. Аналізували профіль температури невеликих квадратних тюків (~25 кг, 79,9% CP), інокульованих з використанням різних комбінацій двох мікроорганізмів (*Pichia anomala* або *Pediococcus pentosaceus*) з двома ферментами (чиста хітиназа або комерційний фермент, що має пектин-ліазну, глюканазну і хітиназну активності).

[105] Метод дослідження

[106] Випробування проводили, використовуючи невеликі квадратні тюки суміші люцерни з травою (45:55) з середньою вагою на момент збирання урожаю 25,0 кг. Середній рівень вологості тюків становив 79,9% СР, в межах очікуваного рівня сухої речовини (80-83% СР). Тюки обробляли різними інокулянтами за допомогою апарату Дормана для внесення бактеріального розчину після обприскування корму перед камерою різання тюка. Згідно з планом експерименту наносили контрольну і чотири різні додаткові суміші мікробних добавок (без добавок, *Pichia anomala*+хітиназа, *Pichia anomala*+суміші ферментів, *Pediococcus pentosaceus*+хітиназа, *Pediococcus pentosaceus*+суміші ферментів).

[107] У кожному виді обробки розпилення виконували, використовуючи шість квадратних тюків, розбитих на три групи по два тюки. Тюки перевозилися в сховищі, зважували і вміщували на піддони за попередньо визначеною повністю рандомізованою схемою таким чином, щоб тюки не контактували один з одним. Кожний пакунок оснащували температурним зондом, який вміщували в геометричний центр тюка. Тюки зберігали протягом 100 днів.

[108] Результати.

[109] Кажучи загалом, ті види обробки, які включали *Pichia anomala* (№2 і 3 в табл. 13), показали повільніше нагрівання тюків, але суміш *Pichia anomala* з хітиназою (№3) значно сповільнювала нагрівання і час, протягом якого температура тюків на 5°C і на 10°C перевищувала температуру навколишнього середовища (таблиця 13). Ця обробка також показала нижчу температуру між 400 і 600 годинами інкубації. Додавання суміші ферментів з штамом *Pichia anomala* приводило до деякого кількісного поліпшення, хоча поліпшення було нижчим, ніж у випадку використання суміші з хітиназою.

[110] До початку нагрівання тюків, оброблених сумішами *Pediococcus pentosaceus* (№4 і 5) проходила більша кількість часу. Використання ферментів обох типів давало порівнянні переваги по зменшенню часу, проведеному при температурі на 10°C вище в порівнянні з температурою навколишнього середовища (таблиця 13).

[111]

Таблиця 13

Опис обробки і дані профілю температури залежно від часу

Номер обробки	Мікробна добавка	ферментна добавка	Час перебування при температурі на 5°C вище навколишньої (год)	Час перебування при температурі на 10°C вище навколишньої (год)
1	Немає	Немає	390,6	290,6 a
2	<i>Pichia anomala</i>	Суміш ферментів	295,2	193,9 ab
3	<i>Pichia anomala</i>	Хітиназа	230,0	120,4 b
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Суміш ферментів	320,4	196,3 ab
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Хітиназа	329,6	224,4 ab
			P=0,0971 SEM=58,24	P=0,0394 SEM=50,43

[112] Хоча винахід був описаний на прикладі конкретних варіантів здійснення, повинно бути зрозуміло, що він може бути модифікований, і цей опис охоплює будь-які зміни, застосування або адаптацію винаходу, загалом, згідно з принципами винаходу і включає такі відхилення від даного розкриття, які входять у відому або звичайну практику в галузі, до якої належить винахід, і які можуть бути застосовані до істотних ознак, викладених вище, і знаходяться в об'ємі прикладеної формули винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Консервант для сіна, який містить або тільки ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю, або в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерії роду *Pediococcus*, в якому а) щонайменше один фермент з хітиназною активністю має хітиназну активність в інтервалі від приблизно 6 U до 300 U на тонну сіна, що підлягає обробці, і b) ефективна для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість

дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus* становить від 10^5 до 10^{15} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна, що підлягає обробці, при цьому кожна одиниця (U) активності ферменту вивільнює близько 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозаміну з хітину (г) на годину при pH 6,0 і за температури 25 °C протягом 2 годин аналізу.

5 2. Консервант для сіна за п. 1, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp.

3. Консервант для сіна за будь-яким з пп. 1-2, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp, що мають всі відмітні характеристики штаму *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003.

10 4. Консервант для сіна за п. 1, в якому бактерії роду *Pediococcus* являють собою *Pediococcus pentosaceus* sp.

5. Консервант для сіна за п. 1 або 4, в якому бактерії роду *Pediococcus* являють собою *Pediococcus pentosaceus* sp, що має всі відмітні характеристики штаму *Pediococcus pentosaceus* BTC328 з номером доступу NCIMB 12674 або штаму BTC401 з номером доступу NCIMB 12675.

15 6. Консервант для сіна за п. 1, в якому щонайменше один фермент з хітиназною активністю знаходиться в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю *Pichia anomala* sp.

7. Консервант для сіна за п. 1, в якому щонайменше один фермент з хітиназною активністю знаходиться в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількістю *Pediococcus pentosaceus* sp.

20 8. Консервант для сіна за пп. 1-7, що додатково містить щонайменше один фермент з пектинліазною активністю, глюканазною активністю або їхню суміш.

9. Спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом води в результаті теплового впливу, а також для його консервації, причому цей спосіб включає додавання в сіно консерванту для сіна, що містить або тільки ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю, або в комбінації з ефективною для консервації сіна і зменшення нагрівання кількістю дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus*, в якому щонайменше один фермент з хітиназною активністю має хітиназну активність в діапазоні від приблизно 6 U до 300 U на тонну підлягаючого обробці сіна, і де ефективна для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus* становить від 10^5 до 10^{15} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна, що підлягає обробці, при цьому кожна одиниця (U) активності ферменту вивільнює близько 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозаміну з хітину (г) на годину при pH 6,0 і за температури 25 °C протягом 2 годин аналізу.

10. Спосіб за п. 9, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою вид *Pichia anomala*.

35 11. Спосіб за будь-яким з пп. 9 або 10, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою вид *Pichia anomala*, що має всі відмітні характеристики штаму *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003.

12. Спосіб за п. 9 або 10, в якому дріжджі роду *Pediococcus* являють собою вид *Pediococcus pentosaceus*.

40 13. Спосіб за п. 9 або 12, в якому дріжджі роду *Pediococcus* являють собою вид *Pediococcus pentosaceus*, що має всі відмітні характеристики штаму *Pediococcus pentosaceus* BTC328 з номером доступу NCIMB 12674 або штаму BTC401 з номером доступу NCIMB 12675.

14. Спосіб за пп. 9-13, що додатково містить щонайменше один фермент, який має пектинліазну активність, глюканазну активність або їхню суміш.

45 15. Сіно з високим вмістом води, що містить консервант для сіна за будь-яким з пп. 1-8.

16. Консервант для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*, де ефективна для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia* або бактерій роду *Pediococcus* становить від 10^5 до 10^{15} життєздатних організмів дріжджів або бактерій на тонну сіна, що підлягає обробці, причому вказаний консервант для сіна містить ефективну для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з хітиназною активністю, де щонайменше один фермент з хітиназною активністю має хітиназну активність в діапазоні від приблизно 6 U до 300 U на тонну підлягаючого обробці сіна, і де кожна одиниця (U) активності ферменту вивільнює близько 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозаміну з хітину (г) на годину при pH 6,0 і за температури 25 °C протягом 2 годин аналізу.

55 17. Консервант для сіна за п. 16, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp.

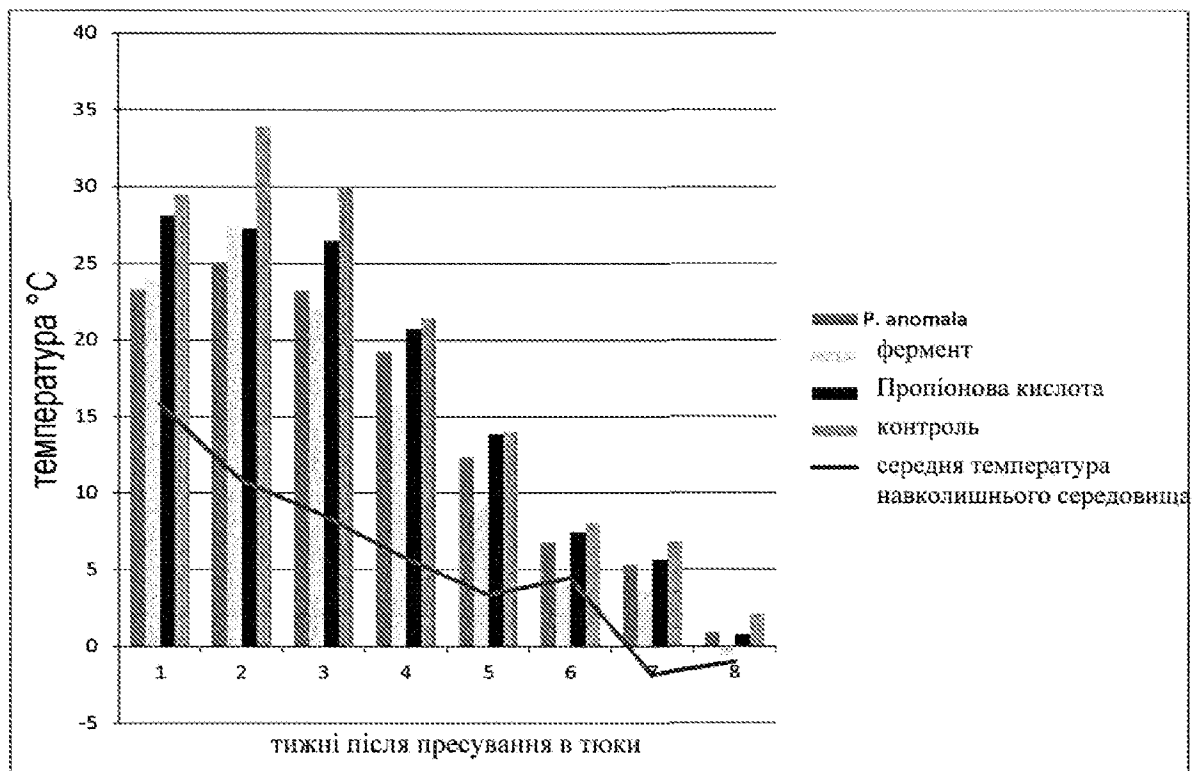
18. Консервант для сіна за п. 16 або 17, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp, що мають всі відмітні характеристики штаму *Pichia anomala* з номером доступу DBVPG 3003.

60 19. Сіно з високим вмістом води, що містить консервант для сіна за будь-яким з пп. 16-18.

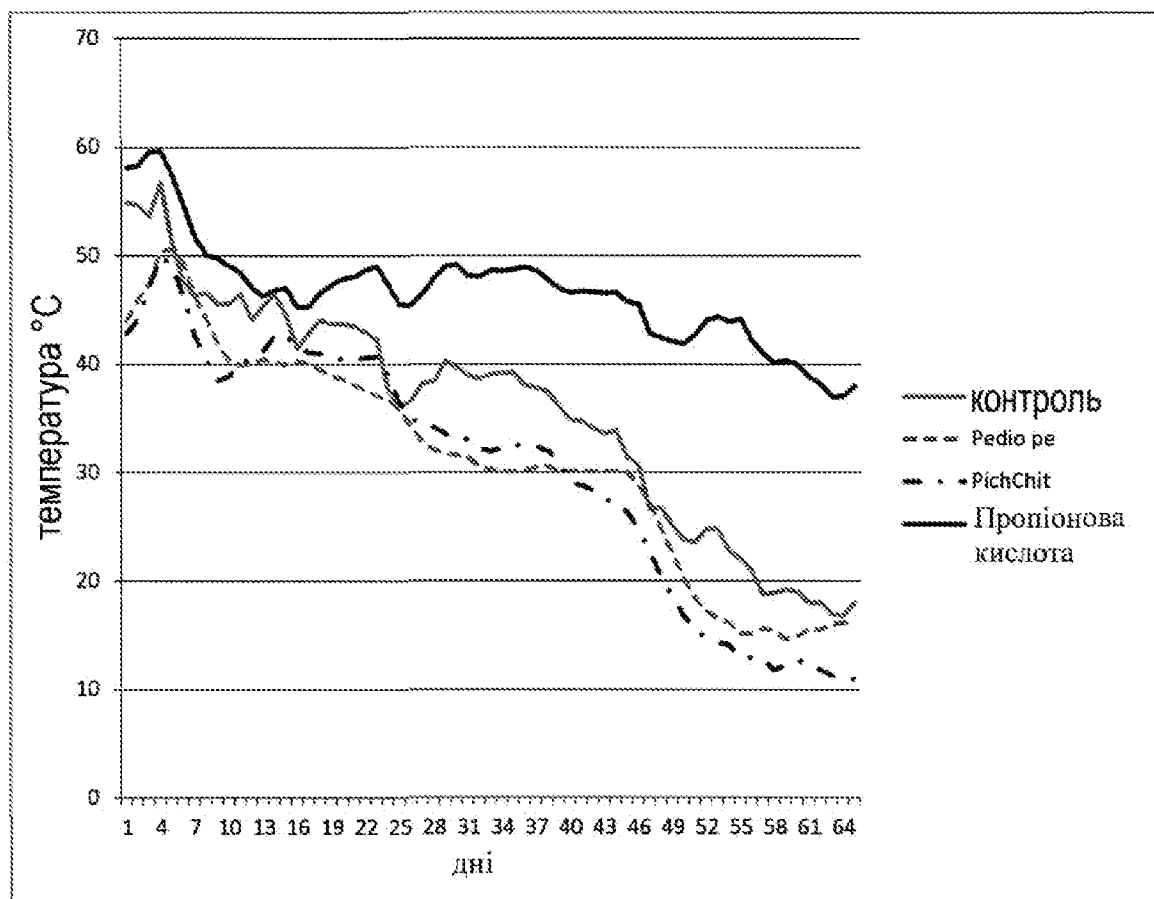
20. Спосіб обробки сіна для запобігання і/або зменшення псування сіна з високим вмістом
 вологи в результаті теплового впливу, а також для його збереження, що включає додавання в
 сіно консерванту для сіна, що містить ефективну для консервації сіна і зменшення його
 нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia*, де вказаний консервант для сіна містить ефективну
 для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість щонайменше одного ферменту з
 хітиназною активністю, де щонайменше один фермент з хітиназною активністю має хітиназну
 активність в діапазоні від приблизно 6 U до 300 U на тонну підлягаючого обробці сіна, і де
 ефективна для консервації сіна і зменшення його нагрівання кількість дріжджів роду *Pichia* або
 бактерій роду *Pediococcus* становить від 10^5 до 10^{15} життєздатних організмів дріжджів або
 бактерій на тонну сіна, що підлягає обробці, і, де кожна одиниця (U) активності ферменту
 вивільнює близько 1,0 мг N-ацетил-D-глюкозаміну з хітину (г) на годину при pH 6,0 і за
 температури 25 °C протягом 2 годин аналізу.

21. Спосіб за п. 20, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp.

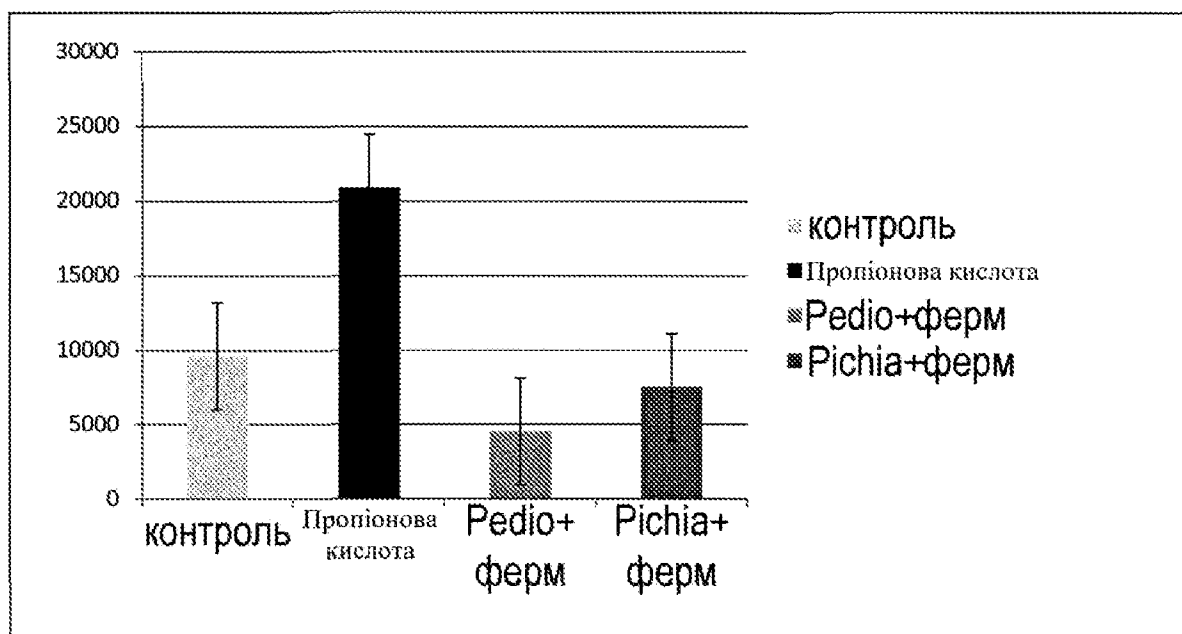
22. Спосіб за п. 20 або 21, в якому дріжджі роду *Pichia* являють собою *Pichia anomala* sp, що
 мають всі відмітні характеристики штаму *Pichia anomala* з порядковим номером DBVPG 3003.



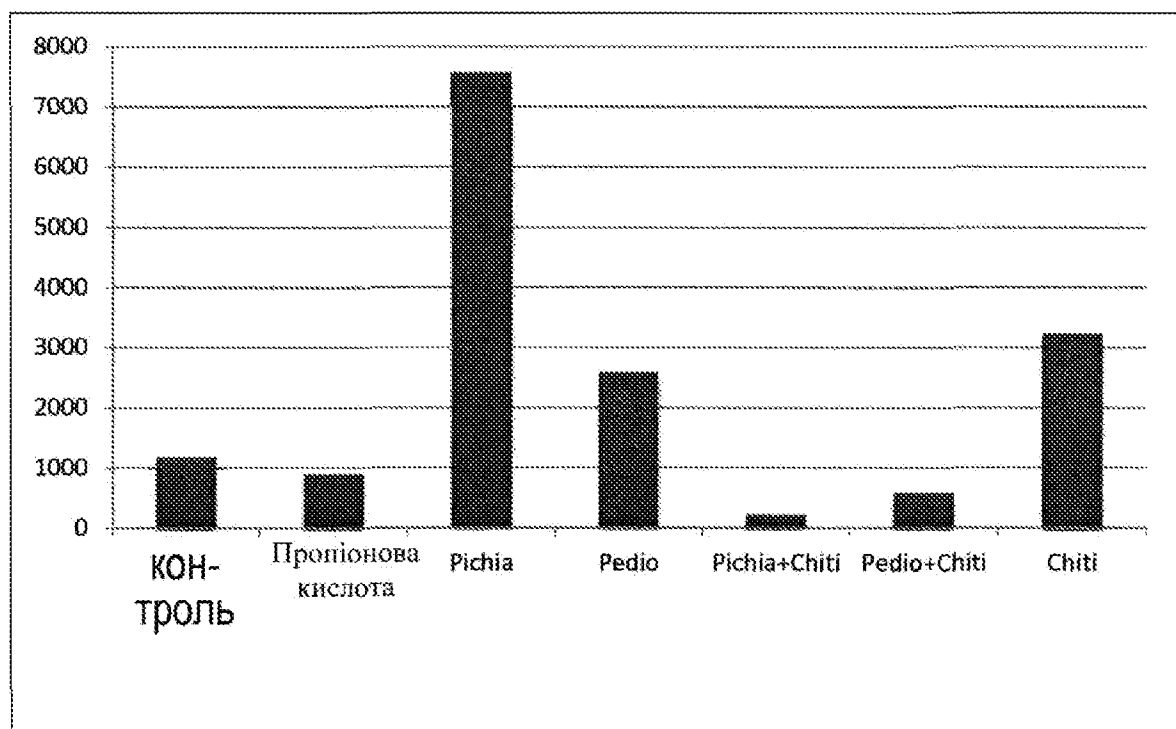
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4