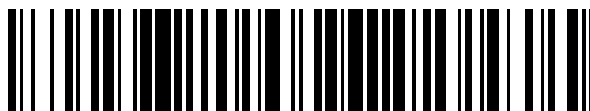


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 445**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/18** (2006.01)

**A23K 30/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014** **E 14182628 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2989899**

54 Título: **Composiciones de especies bacterianas de ácido láctico hetero y homofermentativas para la conservación del ensilado con doble fin**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.01.2017**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**  
**Boege Allé 10-12**  
**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**HINDRICHSEN, IDA;**  
**MILORA, NINA y**  
**OHLSSON, CHRISTER**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 596 445 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de especies bacterianas de ácido láctico hetero y homofermentativas para la conservación del ensilado con doble fin

Campo de la invención

[0001] La presente invención proporciona productos inoculantes bacterianos mejorados que comprenden bacterias heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri* combinadas con especies homofermentativas apropiadas de al menos una de las especies *Lactococcus* y *Enterococcus*.

[0002] Más específicamente, la invención se refiere a un inoculante para ensilaje que como componentes activos sólo comprende bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri* y bacterias homofermentativas de al menos una de las especies *Lactococcus* y *Enterococcus* que no reducen el crecimiento de las bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias.

[0003] Además, la invención se refiere a un método para la producción de un producto de pienso fermentado, dicho método comprende la inoculación de un material vegetal con el inoculante para ensilaje según la invención. Se ha descubierto sorprendentemente que el inoculante para ensilaje es eficaz aunque el ensilaje se haya incubado solo durante un periodo de hasta 14 días.

Antecedentes de la invención

[0004] El ensilaje se puede hacer a partir de varios materiales vegetales que se almacenan bajo condiciones anaeróbicas. Se conserva estableciendo condiciones anaeróbicas y reduciendo rápidamente el pH a través de la producción de ácido orgánico a partir de bacterias de ácido láctico nativas o inoculadas. El pH bajo inhibe el crecimiento de muchas cepas deterioradoras que de otro modo pueden provocar la pérdida de un gran número de nutrientes. Al mismo tiempo, cuando se abre el contenedor, silo, montón o paquete de ensilado para alimentar a animales, tales como rumiantes, el ensilado se expone al aire. Las condiciones aeróbicas pueden, si hay cepas deterioradoras aeróbicas presentes, provocar el crecimiento de cepas deterioradoras. El crecimiento de cepas deterioradoras aeróbicas produce un aumento de la temperatura y altas pérdidas de nutrientes. Tanto el deterioro en el inicio de la fermentación como el deterioro aeróbico en la entrega de alimento representan una pérdida económica para los agricultores.

[0005] La primera generación de inoculantes de ensilado incluía especies bacterianas homofermentativas obligatorias (por ejemplo *L. acidophilus*, *L. salivarius*) y heterofermentativas facultativas (por ejemplo *L. plantarum*) y estaba dirigida a reducir rápidamente el pH para evitar el crecimiento de cepas deterioradoras de origen natural en el material vegetal, tales como *Enterobacteraceae* Gram negativas (por ejemplo *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Shigella*) o *Clostridia* Gram positivas (*C. Tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*). La prevención de las cepas deterioradoras por reducción rápida de pH redujo las pérdidas de nutrientes y frecuentemente hasta cierto punto mejoró la estabilidad aeróbica (Jatkauskas *et al.* (2013), Jatkauskas and Vrotniakiene (2013)).

[0006] La segunda generación de inoculantes de ensilado incluía en primer lugar *L. buchneri*, una especie heterofermentativa obligatoria, que es superior en la prevención del deterioro aeróbico por cepas deterioradoras aeróbicas en la entrega del alimento donde el contenedor/montón de ensilado se expone al aire. La otra cara de la moneda del uso de *L. buchneri* como inoculante de ensilado es que tiene una fase de latencia más larga en comparación con otras especies y en la fase temprana de la fermentación su producción de ácido acético y ácido láctico no reduce el pH rápido, cuando se compara con especies homofermentativas obligatorias o heterofermentativas facultativas.

[0007] Se han desarrollado productos nuevos combinando cepas homofermentativas obligatorias y/o heterofermentativas facultativas con cepas heterofermentativas obligatorias, en primer lugar *L. buchneri*. Con estas combinaciones, el objetivo es una reducción rápida del pH en el inicio y alta estabilidad aeróbica en la entrega del alimento. Estos productos de combinación logran una mejor estabilidad aeróbica en comparación con productos que contienen cepas homofermentativas y/o heterofermentativas facultativas solo, aunque la estabilidad aeróbica no es tan buena como la que se logra con la *L. buchneri* heterofermentativa obligatoria solo. Esto se ilustra en la figura 1 de Jatkauskas y Vrotniakiene (2013), donde *L. buchneri* solo (P0) fue superior para mantener la temperatura baja. El segundo mejor producto para mantener la temperatura baja durante muchas horas fue un producto de combinación heterofermentativo obligatorio/heterofermentativo facultativo/homofermentativo conteniendo *L. buchneri*, *L. plantarum*, *E. faecium*, (P1), que nuevamente estaba seguido de productos puramente heterofermentativos facultativos/homofermentativos conteniendo *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis* con benzoato sódico (P2a) o sin (P2b), un producto heterofermentativo facultativo/homofermentativo conteniendo *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis*, (P3), y un producto heterofermentativo facultativo conteniendo dos cepas de *L. plantarum*, (P4). El ensilado que no fue inoculado tuvo la estabilidad aeróbica más baja.

[0008] Este experimento ilustra que *L. buchneri* solo es superior en comparación con los otros productos evaluados con respecto a la estabilidad aeróbica, es decir, el tiempo que les lleva a las cepas deterioradoras aeróbicas calentar un contenedor de ensilado cuando se vuelve a exponer al aire.

## 5 Resumen de la invención

[0009] El problema que hay que resolver con la presente invención es obtener una fermentación inicial rápida para reducir la pérdida de sustancia seca (SS) y el deterioro en la fase temprana de la fermentación y al mismo tiempo lograr una estabilidad aeróbica que sea la misma o al menos cercana a la de la inoculación con unas cepas heterofermentativas obligatorias tales como *L. buchneri* solo.

[0010] Actualmente, muchos productos en el mercado combinan cepas heterofermentativas facultativas/homofermentativas con alta producción de ácido láctico con *L. buchneri*. Los presentes inventores han descubierto que esta combinación no logra la mejor estabilidad aeróbica posible (es decir, manteniendo la temperatura a temperatura ambiente en la entrega del pienso), probablemente porque reduce el crecimiento de *L. buchneri* y/o produce altas cantidades de ácido láctico que pueden ser utilizadas por cepas deterioradoras aeróbicas y así comenzar el deterioro del ensilado cuando se expone al aire. La ventaja de la presente invención es la combinación de las especies heterofermentativas obligatorias (*L. buchneri*) solo con bacterias homofermentativas de al menos una de las especies *Lactococcus* y *Enterococcus* que no reducen el crecimiento de las bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri*. Tales especies homofermentativas no contrarrestan el efecto positivo de las especies heterofermentativas obligatorias *L. buchneri*, o en un grado mucho menor que en un producto de combinación convencional.

## 25 Divulgación detallada de la invención

[0011] Las bacterias de ácido láctico incluyen géneros tales como *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Lactobacillus spp.* Éstas se pueden dividir en tres subgrupos: heterofermentativas obligatorias, heterofermentativas facultativas y homofermentativas. Las bacterias de ácido láctico del género *Lactobacillus* pueden ser bien heterofermentativas facultativas, bien homofermentativas, dependiendo de las especies (Vandamme *et al.*, 1996).

[0012] Las bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias fermentan hexosas en ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono mediante la vía de fosfogluconato. Ejemplos de especies bacterianas de ácido láctico heterofermentativas obligatorias son *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*.

[0013] Las bacterias de ácido láctico heterofermentativas facultativas adicionalmente pueden fermentar pentosas en ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y etanol, cuando la glucosa está limitada. Ejemplos de bacterias de ácido láctico heterofermentativas facultativas son *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*.

[0014] Las bacterias de ácido láctico homofermentativas son definidas como bacterias que degradan principalmente hexosas por la vía Embden-Meyerhof en ácido láctico. Ejemplos de bacterias de ácido láctico homofermentativas son *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.* y *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*.

[0015] La presente invención se refiere a un inoculante de ensilado que como componentes activos solo comprende bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri* y bacterias homofermentativas de al menos una de las especies *Lactococcus* y *Enterococcus* que no reducen el crecimiento de las bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri*.

[0016] El inoculante de ensilado solo comprende la combinación anterior como componentes activos y no comprende otro(s) componente(s) activo(s) tales como una o más enzimas, ácidos orgánicos, benzoato sódico, nitrato sódico o hexamina.

[0017] Mediante el término "al menos uno" se entiende que la composición puede comprender una o dos de las especies bacterianas homofermentativas *Lactococcus* y *Enterococcus*.

[0018] Evidentemente, las especies bacterianas homofermentativas no deberían reducir el crecimiento de las especies bacterianas de ácido láctico heterofermentativas obligatorias. En caso de duda, se puede evaluar por el crecimiento de las cepas que se tienen que evaluar durante toda la noche en medios de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) a 37°C, estrizando tanto las especies bacterianas homofermentativas como las especies bacterianas de ácido láctico heterofermentativas obligatorias que deben evaluarse en la misma placa de agar MRS sustancialmente al mismo tiempo, y luego incubando la placa de agar bajo condiciones anaeróbicas a 37°C durante toda la noche. Si el crecimiento de las especies bacterianas de ácido láctico heterofermentativas obligatorias es inhibido en al menos 5 mm, entonces la cepa homofermentativa se considera no adecuada para la presente invención. Si el inoculante de ensilado

consiste en más de una especie bacterianas homofermentativa, todas las combinaciones pertinentes deberían ser evaluadas. Mediante tal prueba se ha descubierto que *L. lactis* NCIMB 30117 inhibió *L. buchneri* DSM 22501.

[0019] Una característica importante de las especies bacterianas homofermentativas es que reduce el pH rápido sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico.

[0020] En la presente descripción y reivindicaciones "una cepa que reduce el pH rápido sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico" se define como una cepa que produce no más 3 mg/ml de ácido láctico después de 24 horas de inoculación al baño maría a 30°C de un tubo que contiene 150.000 UFC/mL de la cepa en 10 ml de un medio de ensilado estéril producido mediante la mezcla de 5 g/L de extracto de levadura (Oxoid L21), 5 g/L de soja de peptona neutralizada (Oxoid LP0044C), 0,8 g/L de almidón soluble (Merck 1252), 0,08 g/L de Manganese (II) sulfato dihidrato (Sigma M-1114), 0,037 g/L de ácido succínico (laboratorio de ensayo), 0,069 g/L de monohidrato de ácido cítrico y 0,14 de ácido L-málico (Merck 244) en 900 mL de agua Milli Q hasta disolución, ajustando el pH a 6,3, distribución en biberones y tratamiento en autoclave a 121°C durante 15 minutos, y luego añadiendo 100 ml de solución de azúcar filtrada estéril conteniendo 56 g/L D(-) de fructosa (Merck 4007), 32 g/L D(+) de monohidrato de glucosa (Merck 8342), 20 g/L D(+) de xilosa (Merck 8689), 20 g/L L(+) de arabinosa (Aldrich A9,190-6) y 32 g/L de sacarosa (Merck 7651).

[0021] Según la presente invención, la especie bacteriana de ácido láctico heterofermentativa obligatoria es un *Lactobacillus buchneri*. Ejemplos de *Lactobacillus buchneri* que se contemplan por ser útiles en la presente invención son *L. buchneri* KKP.907, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* NCIMB 40788, *L. buchneri* NCIMB 30139, *L. buchneri* DSM 16774, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* DSM 12856. De la forma más preferible, el *Lactobacillus buchneri* es la cepa *Lactobacillus buchneri* depositada como DSM 22501.

[0022] En una forma de realización del inoculante de ensilado según la invención, al menos una de las especies homofermentativas es un *Enterococcus* tal como un *Enterococcus faecium*. Ejemplos de *Enterococci* que se contemplan por ser útiles en la presente invención son *E. faecium* NCIMB 10415, *E. faecium* CNCM I-3236, *E. faecium* BIO 34 y *E. faecium* DSM 16573.

[0023] En otra forma de realización del inoculante de ensilado según la invención al menos una de las especies homofermentativas es un *Lactococcus* tal como un *Lactococcus lactis*. De la forma más preferible, el *Lactococcus lactis* es la cepa depositada como DSM 11037.

[0024] En una forma de realización actualmente preferida el inoculante de ensilado como componentes activos solo comprende un *Lactobacillus buchneri* y un *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de las bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri*.

[0025] La presente invención también proporciona un método para la producción de un producto de pienso fermentado, dicho método comprende la inoculación de un material vegetal con el inoculante de ensilado según la invención. Se ha descubierto sorprendentemente que los inoculantes de ensilado según la presente invención son capaces de proporcionar un efecto muy rápido. Así, en un método actualmente preferido el material vegetal se inocula con el inoculante de ensilado durante un periodo de hasta 4 días solo antes de que se abra el contenedor de ensilado. Sin embargo, el material vegetal también puede ser inoculado durante un periodo más largo, tal como hasta 7 días, hasta 14 días o hasta 28 días o más largo incluso tal como un periodo de al menos 60 días o al menos 90 días, el último siendo el periodo convencional para probar el efecto de inoculantes de ensilado.

[0026] El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse como incluyendo tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el documento o claramente se contradiga por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, significan "que incluye, pero no está limitado a," a menos que se especifique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento se destina meramente a servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el documento o que se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, tiene meramente por objeto iluminar mejor la invención y no plantea una limitación del ámbito de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ningún lenguaje de la especificación debería ser interpretado como indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

Cepas depositadas

[0027] La cepa de *Lactobacillus plantarum* CH6072 ha sido depositada en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) bajo el número de registro DSM 16568 con una fecha de depósito de 20 de junio de 2008 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho bajo

las condiciones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patentes.

[0028] El *Lactobacillus buchneri* Lb1819 ha sido depositado en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) bajo el número de registro DSM 22501 con una fecha de depósito de 22 abril de 2009 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho bajo las condiciones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patentes.

[0029] La cepa de *Enterococcus faecium* M74 ha sido depositada en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) bajo el número de registro DSM 22502 con una fecha de depósito de 7 de mayo de 2009 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho bajo las condiciones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patentes.

[0030] Para los microorganismos depositados anteriormente identificados, se aplican las siguientes indicaciones adicionales: con respecto a las oficinas de patentes respectivas de los estados designados respectivos, los solicitantes piden que una muestra de los microorganismos depositados mencionados anteriormente sólo esté disponible para un experto designado por el solicitante hasta la fecha en la que la patente se conceda o la fecha en la que la solicitud se haya rechazado o considerado retirada.

[0031] DSM 11037 ha sido depositada en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) el 26 de junio de 1996 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca y se menciona en la patente concedida EP 928333.

[0032] Formas de realización de la presente invención son descritas más adelante, por medio de ejemplos no limitativos.

Leyenda para las figuras

[0033]

Figura 1a. Reducción de pH durante 48 h de medio de ensilado estéril inoculado con composición 1 ( $\Delta$ ), composición 2 ( $\square$ ), composición 3 ( $\circ$ ), composición 4 ( $\diamond$ ) y composición 5 (X). Inicio inoculación fue 150.000 UFC/mL y la temperatura se mantuvo a 30°C, n=1.

Figura 1b. Concentración de ácido láctico durante 48 h de medio de ensilado estéril inoculado con composición 1 ( $\Delta$ ), composición 2 ( $\square$ ), composición 3 ( $\circ$ ), composición 4 ( $\diamond$ ) y composición 5 (X). Inicio de inoculación fue 150.000 UFC/mL y la temperatura se mantuvo a 30°C, n=1.

Figura 1c. Concentración de ácido acético durante 48 h de medio de ensilado estéril inoculado con composición 1 ( $\Delta$ ), composición 2 ( $\square$ ), composición 3 ( $\circ$ ), composición 4 ( $\diamond$ ) y composición 5 (X). Inicio inoculación fue 150.000 UFC/mL y la temperatura se mantuvo a 30°C.

Figura 2. Reducción de pH durante 72 h de medio de ensilaje estéril inoculado con composición 2 ( $\square$ ), composición 4 ( $\diamond$ ) y composición 6 ( $\square$ ). Inicio de inoculación fue 150.000 UFC/mL y la temperatura se mantuvo a 30°C.

Figura 3. Proporción de ácido acético/ácido láctico de maíz cosechado en 2011 en Dinamarca (mini-silo 1) y bien no inoculado (barras blancas), inoculado con composición 4 (barras grises) o composición 7 (barras negras). Las bolsas de vacío del mini silo fueron almacenadas a 25 °C hasta su apertura después de 7, 28, 61 y 88 días.

Figura 4. Estabilidad aeróbica del maíz cosechado en 2012 en Dinamarca (mini-silo 2) y bien no inoculado ( $\blacksquare$ ), inoculado con composición 4 ( $\diamond$ ) o composición 5 (X). La línea negra discontinua muestra temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

Figura 5. El pH del mini silo con ensilado de maíz cosechado en 2012 (mini-silo 2) después de siete días de inoculación aeróbica incl. SEM de cuatro observaciones. No inoculado (barra blanca), inoculado con composición 4 (barra gris) o composición 5 (barra de puntos).

Figura 6. La estabilidad aeróbica del maíz cosechado en 2013 en Dinamarca (mini-silo 3) y bien no inoculado ( $\blacksquare$ ), inoculado con composición 2 ( $\square$ ) o composición 4 ( $\diamond$ ). Línea negra discontinua muestra temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

Figura 7. Estabilidad aeróbica de forraje de maíz rojo cosechado en 2013 (mini-silo 4) y bien no inoculado (■), inoculado con composición 2 (□), composición 4 (◇) y composición 7 (▲). La línea negra discontinua muestra temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

Figura 8. Estabilidad aeróbica de forraje trébol rojo:timotea:festuca cosechado en 2013 (mini-silo 5) y bien no inoculado (■), inoculado con composición 2 (□), composición 4 (◇), composición 7 (▲). La línea negra discontinua muestra temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Cultivos de lote in vitro estériles

[0034] Cepas únicas de bacterias de ácido láctico homofermentativas y heterofermentativas y productos de combinación fueron evaluados en dos disposiciones experimentales independientes. El pH y el ácido orgánico fueron medidos en el tiempo en un medio estéril que contenía varias fuentes de carbohidratos diferentes para simular la composición de carbohidratos del césped. El medio contenía 5 g/L de extracto de levadura (Oxoid L21), 5 g/L de soja de peptona neutralizada (Oxoid LP0044C), 0,8 g /L de almidón soluble (Merck 1252), 0,08 g/L de Manganese (II) sulfato dihidrato (Sigma M-1114), 0,037 g/L de ácido succínico (laboratorio de ensayo), 0,069 g/L de monohidrato de ácido cítrico y 0,14 de ácido L-málico (Merck 244) que fue mezclado en 900 mL de agua Milli Q hasta disolución. El pH fue ajustado a 6,3 y distribuido en biberones y sometido a autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después del autoclave se añadió 100 ml de solución estéril de azúcar filtrada conteniendo 56 g/L D(-) fructosa (Merck 4007), 32 g/L D(+) monohidrato de glucosa (Merck 8342), 20 g/L D(+) xilosa (Merck 8689), 20 g/L L(+) arabinosa (Aldrich A9,190-6) y 32 g/L sacarosa (Merck 7651). Este medio se denomina medio de ensilado. En ambos experimentos 1 y 2 el medio de ensilado estéril fue usado e inoculado con las varias diferentes composiciones mencionadas en la tabla 1.

Tabla 1

| Composiciones de cepa usadas en los dos estudios de cultivo discontinuo <i>in vitro</i> |             |                               |            |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------|------------|---------|
| Número de composición                                                                   | Experimento | Cepas bacterianas             | Porcentaje | UFC/ml  |
| 1                                                                                       | 1           | <i>L. plantarum</i> DSM 16568 | 100        | 150.000 |
| 2                                                                                       | 1. 2        | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 100        | 150.000 |
| 3                                                                                       | 1           | <i>L. lactis</i> DSM 11037    | 100        | 150.000 |
| 4                                                                                       | 1. 2        | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 50         | 150.000 |
|                                                                                         |             | <i>L. lactis</i> DSM 11037    | 50         |         |
| 5                                                                                       | 1           | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 70         | 150.000 |
|                                                                                         |             | <i>L. lactis</i> DSM 11037    | 20         |         |
|                                                                                         |             | <i>L. plantarum</i> DSM 16568 | 10         |         |
| 6                                                                                       | 2           | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 50         | 150.000 |
|                                                                                         |             | <i>L. plantarum</i> DSM 16568 | 50         |         |

#### Experimento 1

[0035] 10 ml del medio de ensilado inoculado con las varias composiciones de la tabla 1 se distribuyó en once tubos estériles para cada composición y se mantuvo al baño maría a 30°C. Después de 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 24 y 48 horas, se tomaron muestras para análisis de ácido orgánico volátil (AOV) y de ácido láctico y pH. El pH fue monitorizado utilizando un medidor de pH manual, mientras que los ácidos orgánicos volátiles fueron analizados en una HPLC (Dionex).

#### Experimento 2

[0036] En la disposición experimental 2 se usó el mismo medio de ensilado estéril, nivel de inoculación y temperatura. Estas composiciones temporales 2, 4 y 6 fueron inoculadas y se usó un medidor de pH automático. Ácido acético, ácido láctico y ácido fórmico fueron medidos en una HPLC (Dionex) después de 72 h.

#### Resultados

[0037] Los resultados de las diferentes composiciones en el pH y ácido orgánico se proporcionan en las figuras 1a, b, c y figura 2 al igual que en la tabla 2.

[0038] La figura 1a muestra que la composición 2 redujo el pH muy lentamente. La composición 1 y la composición 3 reducen el pH mucho más rápido y después de 14 horas el pH estaba por debajo de 5,0 mientras que la composición 2 todavía tenía un pH por encima de 6,0. La composición 4 redujo el pH tan rápidamente como la composición 3. La composición 5 dio como resultado una curva de pH muy similar a la composición 1.

[0039] La figura 1b muestra la concentración de ácido láctico a lo largo del tiempo. Después de 24 horas, la composición 1 produjo mucho más ácido láctico en comparación con la composición 2, composición 3 o composición 4. Después de 48 horas, la concentración de ácido láctico de la composición 1 fue más de 8 mg/ml a diferencia de los 4 mg/ml o menos con la composición 2, composición 3 o composición 4. La composición 5 dio como resultado una concentración de ácido láctico muy similar a la composición 1.

[0040] La figura 1c muestra la concentración de ácido acético a lo largo del tiempo. Después de 48 horas, la composición 2 tiene una concentración por encima de 2 mg/ml de ácido acético, mientras que la composición 1 y la composición 3 produjeron menos de 0,5 mg/ml. La composición 4 produjo 1 mg/ml de ácido acético después de 48 h, mientras que la composición 5 dio como resultado una concentración de menos de 0,5 mg/ml.

[0041] La figura 2 muestra otra vez cómo la composición 2 redujo el pH muy lentamente. La composición 4 redujo el pH mucho más rápido y después de 15 horas el pH estaba por debajo de 4,5, mientras que la composición 6 todavía tenía un pH por encima de 6,0. La composición 6 dio como resultado una caída de pH ligeramente más lenta en comparación con la composición 4. Sin embargo, la reducción de pH continuó rápidamente y el pH estaba por debajo de 4,0 ya después de 18 horas. Después de 72 horas el pH de la composición 2 y la composición 4 alcanzaron 3,6 y 3,7, respectivamente, mientras que la composición 6 fue tan bajo como 3,2.

Tabla 2

| Producción de ácido orgánico de medio de ensilado estéril inoculado después de 72 horas |                               |     |                       |                       |                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Número de composición                                                                   | Cepas bacterianas             | %   | Ácido fórmico (mg/ml) | Ácido acético (mg/ml) | Ácido láctico (mg/ml) |
| 2                                                                                       | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 100 | 0,012                 | 2,895                 | 4,077                 |
| 4                                                                                       | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 50  | 0,447                 | 1,760                 | 3,488                 |
|                                                                                         | <i>L. lactis</i> DSM 11037    | 50  |                       |                       |                       |
| 6                                                                                       | <i>L. buchneri</i> DSM 22501  | 50  | 0,014                 | 0,554                 | 10,777                |
|                                                                                         | <i>L. plantarum</i> DSM 16568 | 50  |                       |                       |                       |

[0042] La tabla 2 muestra cómo la producción de ácido acético se reduce fuertemente en la composición 6, que combina *L. buchneri* DSM 22501 con *L. plantarum* DSM 16568 a diferencia de la composición 4, que combina *L. buchneri* DSM 22501 con *L. lactis* DSM 11037. La composición 6 también mostró una concentración de ácido láctico alta después de 72 horas. La composición 4 no solo tenía una concentración de ácido acético mucho más alta en comparación con la composición 6, sino que también tuvo una concentración alta de ácido fórmico.

## Ejemplo 2 - estabilidad aeróbica en mini-silos

[0043] Cinco experimentos de mini silo diferentes fueron configurados para evaluar las diferentes composiciones de inoculante de ensilado. Tres experimentos fueron establecidos en Dinamarca con maíz cosechado de tres granjas diferentes en 2011 (mini silo 1), 2012 (mini silo 2) y 2013 (mini silo 3) y dos experimentos fueron realizados en Lituania en 2013 utilizando maíz y césped trébol rojo: timotea: festuca (60:30:10) (Mini-silos 4 y 5). Una visión de conjunto de los inoculantes que fueron aplicados y el índice de aplicación se enumeran en la tabla 3.

Tabla 3

| Composiciones de cepa usadas en los cinco estudios de mini-silo |                     |         |                   |            |               |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|---------|-------------------|------------|---------------|
| Número de composición                                           | Número de mini silo | Forraje | Cepas bacterianas | Porcentaje | UFC/g forraje |

| Composiciones de cepa usadas en los cinco estudios de mini-silo |                     |                       |                                                                                              |                |               |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|
| Número de composición                                           | Número de mini silo | Forraje               | Cepas bacterianas                                                                            | Porcentaje     | UFC/g forraje |
| Sin aditivos                                                    | 1, 2, 3, 4, 5       | Maíz<br>Césped/Trébol |                                                                                              | 0              |               |
| 2                                                               | 3, 4<br>5           | Maíz<br>Césped/Trébol | <i>L. buchneri</i> DSM 22501                                                                 | 100            | 150.000       |
| 4                                                               | 1, 2, 3, 4, 5       | Maíz<br>Césped/Trébol | <i>L. buchneri</i> DSM 22501<br><i>L. lactis</i> DSM 11037                                   | 50<br>50       | 150.000       |
| 5                                                               | 2                   | Maíz                  | <i>L. buchneri</i> DSM 22501<br><i>L. lactis</i> DSM 11037<br><i>L. plantarum</i> DSM 16568  | 70<br>20<br>10 | 150.000       |
| 7                                                               | 1, 4<br>5           | Maíz<br>Césped/Trébol | <i>L. buchneri</i> DSM 22501<br><i>E. faecium</i> DSM 22502<br><i>L. plantarum</i> DSM 16568 | 50<br>30<br>20 | 150.000       |

[0044] Para el mini silo 1, el maíz fue cosechado en South-West Jutland. El transporte hasta que el laboratorio fue de 4 horas. Después, el maíz fue almacenado durante toda la noche fuera antes de ser congelado a -20°C. En el momento de la inoculación, el maíz fue descongelado durante 1-2 horas y luego se mantuvo en la nevera a 4-5°C. Inoculantes fueron suspendidos en agua del grifo e introducidos en matraces de pulverización. La dosificación prevista para cada tratamiento fue 150.000 UFC/g de maíz y la cantidad que se necesitó para alcanzar el inóculo previsto fue calculada basada en la potencia real de las composiciones. 1000g fueron pesados en una bolsa de plástico de poco en poco de modo que el inoculante se pudiera pulverizar homogéneamente sobre el maíz. La bolsa fue luego agitada para asegurar una distribución igual del inóculo de la bolsa. Los 1000g de maíz inoculado fueron luego distribuidos a cinco bolsas de aluminio 200g para cada punto de tiempo (7, 28, 61 y 88 días). Las bolsas de aluminio envasadas al vacío fueron almacenadas a 25°C.

[0045] Cinco bolsas de aluminio por tratamiento fueron abiertas en diferentes puntos de tiempo. Las muestras fueron luego medidas para ácidos orgánicos pequeños.

[0046] Para el mini silo 2, maíz recién cosechado fue recogido de una granja en Zealand central, Dinamarca, y transportado al laboratorio directamente. Los cinco tratamientos diferentes enumerados en la tabla 3, al igual que un grupo de control, fueron evaluados en una configuración de mini silo.

[0047] Inoculantes fueron suspendidos en agua del grifo e introducidos en matraces de pulverización. La dosificación prevista para cada tratamiento fue 150.000 UFC/g de maíz y la cantidad que se necesitó para alcanzar el inóculo previsto fue calculada basada en la potencia real de los productos. 1000 gramos de maíz fueron pesados una bolsa poco a poco de modo que el inoculante se pudiera pulverizar homogéneamente sobre el maíz. Después de agitar la bolsa para asegurar más distribución del inóculo, la bolsa fue envasada al vacío. Cuatro bolsas de cada tratamiento fueron preparadas y almacenadas a 25°C para posterior análisis después de tres meses.

[0048] Después de tres meses, un estudio de estabilidad aeróbica fue establecido con ensilado almacenado en las bolsas de vacío. El ensilado fue distribuido en contenedores (botellas plásticas abiertas en la parte superior con un orificio en la parte inferior) con un sensor de temperatura situado en el medio, colocado en un hueco de poliestireno, cubierto con una placa de plástico grande, y almacenado a temperatura ambiente. La temperatura de cada muestra individual después de la exposición al aire fue monitorizada durante un periodo de 7 días.

[0049] Para el mini silo, 3 maíz recién cosechado fue recogido de una granja en el noreste de Zealand. El procedimiento fue el mismo que el descrito en el mini silo 2, excepto que el estudio de estabilidad aeróbico fue realizado después de solo dos semanas.

Resultados de mini silo 1, 2 y 3



[0050] La proporción de ácido acético a ácido láctico del mini silo 1 en diferentes puntos de tiempo se muestra en la figura 3. La proporción de ácido acético a ácido láctico es más alta en el control no inoculado en comparación con la composición 7 después de siete días y después de 28 días. Sin embargo, después de 88 días, composición 7 tiene una alta proporción de ácido acético a ácido láctico en comparación con el control. La composición 4 tiene una alta proporción de ácido acético a ácido láctico desde el día siete que aumenta a lo largo del tiempo. El pH medio de todas las muestras está por debajo de 4,0 en todos los puntos temporales.

[0051] Los resultados del mini silo 2 se muestran en la figura 4. Se puede observar que la temperatura del ensilado de control no inoculado estaba por encima de 3°C sobre la temperatura ambiente después de 78 horas, mientras que la composición 5 fue por encima de 3°C sobre la temperatura ambiente después de 96 horas. La composición 4 mantuvo el ensilado de maíz estable durante todas las 162 horas de medición. Después 162 horas, el pH del control fue de media a 6,74, mientras que el ensilado tratado con la composición 5 tuvo un promedio de pH 5,67 y la composición 4 un promedio de pH de pH 4,05 (figura 5).

[0052] Al abrir los mini silos empaquetados al vacío en el mini silo 3 el ensilado que no fue inoculado fue inestable después de 93 horas, mientras que la composición 2 fue estable durante el periodo entero de 160 horas y la composición 4 fue capaz de mantener el ensilado estable durante 129 horas (figura 6).

Mino-silos 4 y 5 - maíz y césped/trébol cosecha 2013, Lituania

[0053] Maíz (*Zea mays* L.) fue cosechado en la fase de masa de la maduración del grano. La concentración de sustancia seca (SS) del maíz fue 38,85% y la concentración de carbohidratos solubles en agua fue 2,54%. El maíz fue desmenuzado por una segadora de forraje bajo condiciones de granja en piezas de aproximadamente 2 cm de longitud (mini silo 4).

[0054] La mezcla césped trébol contenía 60% de trébol rojo, 30% de timotea y 10% de festuca y fue cosechada y secada para dar una sustancia seca de 32,8%. Esta mezcla de forraje se denomina mezcla de césped/trébol, y el carbohidrato soluble en agua fue 20,3 g/kg de SS (2,03% forraje fresco). El césped/trébol fue desmenuzado por una segadora de forraje bajo condiciones de granja en piezas de 2-3 cm de longitud (mini silo 5).

[0055] Tanto para el mini silo 4 como para el mini silo 5, se tomaron cinco muestras representativas (>500 g cada una) para análisis de valor nutricional de ambos forrajes y tratamiento. Los forrajes fueron transportados en una bolsa de polietileno al laboratorio. Los experimentos de laboratorio comenzaron 0,5 h desde la preparación de la planta de cultivo. Una muestra de 500 g representativa de hierba marchita y desmenuzada fue tomada para análisis de valor nutricional, capacidad tamponadora, nitrato y composición microbiana. Los mismos inoculantes de ensilado y procedimiento fueron usados en los ensayos de maíz y de forraje de césped/trébol.

[0056] El inoculante de ensilado fue suspendido en agua destilada inmediatamente antes de su aplicación buscando una dosis como se describe en la tabla 3. Cinco réplicas fueron realizadas para cada tratamiento. Los índices de aplicación de los productos fueron calculados según la dosis establecida en la tabla 3 y la concentración bacteriana real de los productos. Se usó agua sin cloro para la dilución de los productos. El mismo volumen de agua destilada fue usado en vez de la suspensión en el tratamiento de control (para fermentación espontánea). Después de la inoculación, jarras de cristal de 3-L fueron rellenas con 1,80-1,84 kg de la planta de cultivo fresca igualmente a 1 kg de SS por volumen de 5 litros. Las jarras fueron cerradas con tapas 15 min después de ser rellenas. La producción de gas durante la fermentación fue liberada con una salida de aire de gas durante el experimento. Después de 90 días de almacenamiento de las jarras de cristal, a una temperatura constante de 20°C, se realizaron análisis químicos y microbianos.

[0057] Para medir la estabilidad aeróbica de los ensilados, la temperatura fue monitorizada dentro del ensilado durante 10 días. Para ello, cables de termopar fueron insertados en el punto medio de las muestras de ensilado que fueron colocadas en cajas de poliestireno abiertas. La parte superior e inferior de las cajas contenía un agujero de 2 cm de diámetro para permitir que entrara aire y CO<sub>2</sub> saliera. Un transductor fue colocado en el centro de la masa de ensilado a través de un agujero en la cubierta de la caja, que exponía el ensilado al aire. Estos ensilados no se perturbaron durante el periodo de registro de las temperaturas. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente constante (≈20°C). La temperatura ambiente y la temperatura de cada ensilado fue registrada cada 6 h por un registrador de datos. La temperatura ambiente ambiental fue medida usando una caja de control vacía. La estabilidad aeróbica de los ensilados fue examinada calculando las diferencias entre temperatura de ensilado y temperatura ambiente ambiental. El deterioro aeróbico estuvo marcado por los días (u horas) hasta el inicio de un aumento sostenido de la temperatura superior a 3°C sobre la temperatura ambiente.

Tabla 4

|                    |
|--------------------|
| Métodos analíticos |
|--------------------|

## ES 2 596 445 T3

| Parámetros de calidad             | Objeto     | Breve descripción o esencia del método, referencia                                                                                                                                |
|-----------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sustancia seca (SS)               | Forraje*   | Secado al horno a 67°C durante 24 h, equilibrado a humedad ambiente durante la noche, triturado a través de una criba de 1mm y secado después a 105°C a peso constante            |
|                                   | Ensilado** |                                                                                                                                                                                   |
| Proteína bruta                    | *          | Kjeldahl-AOAC 984.13. 10,5 g de catalizador es usado. Con digestión en bloque y unidad de destilación 1002 sistema Tecator Kjeltec                                                |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Grasa bruta                       | *          | Extracción por sistema Soxtec utilizando éter de petróleo 40-600C. Residuos de grasa cruda determinados gravimétricamente después del secado.                                     |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Fibra bruta                       | *          | Con Fibercap (Foss Tecator) usando ácido sulfúrico y tratamiento con hidróxido de Na                                                                                              |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Fibra de detergente ácido (FDA)   | *          | ANKOM A200 Tecnología de filtro con bolsa (FBT)                                                                                                                                   |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Fibra de detergente neutro (FDN)  | *          | A200 Tecnología de filtro con bolsa (FBT)                                                                                                                                         |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Carbohidratos hidrosolubles (CHS) | *          | Usando el ensayo de reacción de la antrona (MAFF, 1986), a partir de los extractos de forraje o ensilado obtenidos a partir de la maceración de forraje fresco o ensilado en agua |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Ceniza bruta                      | *          | Método AOAC 942.05. Incineración en seco Ca - AOAC 968.08, método espectrofotométrico de absorción atómica, método de molibdovanadofosfato P-espectrofotométrico                  |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Capacidad tamponadora             | *          | Según Playne y McDonald (1966), expresado como miliequivalentes de álcali requirió cambio del pH de 4 a 6 por 100 g de sustancia seca                                             |
| Nitrato                           | *          | Obtención de extractos de forraje a partir de la maceración de forraje fresco en agua analizados usando el electrodo selectivo de iones de nitrato                                |
| Ácido láctico                     | **         | En un extracto acuoso a partir de ensilado fresco según los métodos estándar (Naumann y Bassler, 1997)                                                                            |
| Ácido acético                     | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Ácido butírico                    | **         |                                                                                                                                                                                   |
| N amoniacal                       | **         | Destilación - AOAC 941.04                                                                                                                                                         |
| pH tras 3, 90 y 97 días           | **         | Extractos de ensilado obtenidos a partir de maceración de forraje fresco en agua analizados usando el electrodo ThermoOrion Posi-pHlo SympHony y el medidor Thermo Orion 410      |
| pH antes del ensilado             | *          |                                                                                                                                                                                   |
| Pérdida de peso (pérdidas de SS)  | **         | Estimado midiendo diferencias en pesos de silo antes y después del ensilado                                                                                                       |
| Levaduras y mohos                 | *          | LST ISO 21527-2:2008                                                                                                                                                              |
|                                   | **         |                                                                                                                                                                                   |
| Bacteria de ácido láctico         | *          | ISO 15214:1998                                                                                                                                                                    |
| Clostridia***                     | *          | ISO 7937:2004                                                                                                                                                                     |

[0058] \* Cinco muestras de forraje para análisis fueron recogidas después de pulverización y en el momento de relleno de los silos \*\* Ensilado de cada silo en cada una de las variantes (incluyendo control) fueron muestreados después de 90 días de almacenamiento \*\*\* Si más de 1500 ufc/g de clostridia en el forraje fresco, se hacen análisis del ensilado para AOV de clostridia y ácido láctico y concentraciones de alcohol inferiores fueron determinadas por cromatografía de gas-líquido en los extractos de ensilado acuosos obtenidos del remojo de 30 g de ensilado fresco en 150 ml de agua desionizada durante 16 h a 40°C en un contenedor sellado, seguido de una filtración preliminar a través de papel de filtro de 3µm. Agua desionizada (3ml) de una solución estándar interna (0,5 g de ácido 3-metil-n-valérico en 1.000 ml 0,15mol l<sup>-1</sup> ácido oxálico) se añadió a 1 ml de filtrado de lo anterior, y la solución filtrada a través de una membrana de 0,45 µm de polietersulfona en un frasco de muestra cromatográfica para análisis. Cromatógrafo de gas-líquido GC-2010 SHIMADZU utilizó columna capilar de orificio amplio (Stabilwax®-DA 30 m, 0,53 mm, ID, 0,5µm) según los métodos oficiales del analizador de cromatografía de gases y bioquímica. Nitrógeno de amonio (NH<sub>3</sub>N) fue determinado por destilación - AOAC 941.04.

#### 15 Resultados del mini silo 4 y 5

[0059] Los resultados del mini silo de maíz 4 se muestran en la tabla 5. Los tres ensilados de maíz inoculados tuvieron un pH significativamente inferior (P>0,05) en comparación con el control después de 3 días de fermentación anaeróbica. La composición 4 y la composición 7 tuvieron significativamente menos pérdida de SS (%/kg), significativamente (P<0,05) menos fracción de N-NH<sub>3</sub> (%/kg de total de N) y una concentración significativamente (P<0,05) más alta de ácido láctico (%/kg SS) en comparación con la composición 2 y el control. La inoculación de maíz con la composición 2 y la composición 4 dio como resultado concentraciones significativamente (P<0,05) más altas de ácido acético (%/kg SS) y ácido propiónico (%/kg SS) en comparación con la composición 7 y el control. Todos los ensilados de maíz inoculados tuvieron un recuento de levadura y de moho inferior (log UFC/g) en comparación con el control.

[0060] Como se puede observar en la figura 7, exposición aeróbica de 10 días dio como resultado un ascenso de temperatura por encima de 3°C de la temperatura ambiente después de 66 horas para el ensilado no inoculado, mientras que la composición 7 fue por encima de 3°C de la temperatura ambiente después de 178 horas, los que fue significativamente (P<0,05) más tiempo en comparación con el control y significativamente (P<0,05) menos tiempo en comparación con las composiciones 2 y 4. Después de 240 horas de exposición aeróbica, el pH del control fue tan alto como 8,29, mientras que la composición 7 tenía un pH de 5,66, que fue significativamente (P<0,05) inferior en comparación con el control.

Tabla 5

| Efecto de varias composiciones en las variables de fermentación y composición microbiana de maíz ensilado |         |                               |                               |                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
|                                                                                                           | Control | Composición 2<br>(porcentaje) | Composición 4<br>(porcentaje) | Composición 7<br>(porcentaje)         |
| <i>L. buchneri</i> DSM 22501                                                                              |         | 100                           | 50                            | 50                                    |
| <i>L. lactis</i> DSM 11037                                                                                |         |                               | 50                            |                                       |
| <i>E. faecium</i> DSM 22502                                                                               |         |                               |                               | 30                                    |
| <i>L. plantarum</i> DSM 16568                                                                             |         |                               |                               | 20                                    |
| Medición después de 3 días de fermentación anaeróbica                                                     |         |                               |                               |                                       |
| pH después de 3 días                                                                                      |         | 4,36 <sup>a</sup>             | 4,18 <sup>b</sup>             | 4,17 <sup>b</sup> 4,14 <sup>c</sup>   |
| Medición después de 90 días de fermentación anaeróbica                                                    |         |                               |                               |                                       |
| pH después de 90 días                                                                                     |         | 4,04 <sup>a</sup>             | 3,91 <sup>b</sup>             | 3,92 <sup>b</sup> 3,90 <sup>b</sup>   |
| SS, %/kg desiletdt                                                                                        |         | 36,69 <sup>a</sup>            | 37,52 <sup>b</sup>            | 37,62 <sup>b</sup> 37,77 <sup>b</sup> |
| Pérdida de SS, %/kg                                                                                       |         | 6,74 <sup>a</sup>             | 4,42 <sup>b</sup>             | 3,90 <sup>c</sup> 3,43 <sup>c</sup>   |
| Fracción N-NH <sub>3</sub> , %/kg N total                                                                 |         | 5,18 <sup>a</sup>             | 4,38 <sup>b</sup>             | 3,92 <sup>c</sup> 3,83 <sup>c</sup>   |
| Ácido láctico, %/kg SS                                                                                    |         | 2,78 <sup>a</sup>             | 3,01 <sup>a</sup>             | 3,47 <sup>c</sup> 4,06 <sup>b</sup>   |
| Ácido acético, %/kg SS                                                                                    |         | 1,11 <sup>c</sup>             | 2,83 <sup>a</sup>             | 2,68 <sup>a</sup> 1,72 <sup>b</sup>   |
| Ácido butírico, %/kg SS                                                                                   |         | 0,034 <sup>a</sup>            | 0,008 <sup>b</sup>            | 0,006 <sup>b</sup> 0,004 <sup>b</sup> |
| Ácido propiónico, %/kg SS                                                                                 |         | 0,012 <sup>b</sup>            | 0,028 <sup>a</sup>            | 0,026 <sup>a</sup> 0,012 <sup>b</sup> |

| Efecto de varias composiciones en las variables de fermentación y composición microbiana de maíz ensilado                                                                         |         |                               |                               |                               |                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
|                                                                                                                                                                                   | Control | Composición 2<br>(porcentaje) | Composición 4<br>(porcentaje) | Composición 7<br>(porcentaje) |                    |
| Alcoholes, %/kg SS                                                                                                                                                                |         | 1,00 <sup>a</sup>             | 0,62 <sup>b</sup>             | 0,50 <sup>c</sup>             | 0,49 <sup>c</sup>  |
| Levadura (log UFC/g)                                                                                                                                                              |         | 3,93 <sup>a</sup>             | 1,04 <sup>b</sup>             | 1,26 <sup>c</sup>             | 1,56 <sup>c</sup>  |
| Mohos (log UFC/g)                                                                                                                                                                 |         | 3,00 <sup>a</sup>             | 1,0 <sup>b</sup>              | 1,16 <sup>b</sup>             | 1,25 <sup>c</sup>  |
| Medición después de 10 días de exposición aeróbica                                                                                                                                |         |                               |                               |                               |                    |
| pH después de test de estabilidad                                                                                                                                                 |         | 8,29 <sup>a</sup>             | 4,44 <sup>b</sup>             | 4,39 <sup>b</sup>             | 5,66 <sup>c</sup>  |
| Estabilidad aeróbica, horas                                                                                                                                                       |         | 66,0 <sup>b</sup>             | 240,0 <sup>a</sup>            | 240,0 <sup>a</sup>            | 177,6 <sup>c</sup> |
| Letras diferentes en una fila muestran diferencia estadísticamente significativa (P<0,05)<br>No hubo ningún efluente al abrir el silo<br>†Sustancia seca corregida para volátiles |         |                               |                               |                               |                    |

[0061] Los resultados del mini silo 5 usando césped/trébol se muestran en la tabla 6. Los tres ensilados de césped/trébol inoculados tuvieron un pH significativamente (P>0,05) inferior en comparación con el control después de 3 días de fermentación anaeróbica. La composición 4 y la composición 7 tuvieron significativamente (P<0,05) menos pérdida de SS (%/kg). Mientras que todos los ensilados de césped/trébol inoculados tuvieron significativamente (P<0,05) menos fracción de N-NH<sub>3</sub> (%/kg de N total) en comparación con el control y significativamente (P<0,05) mayor concentración de ácido láctico (%/kg SS) que el control, la inoculación de maíz con la composición 4 dio como resultado una concentración significativamente (P<0,05) más alta de ácido acético (%/kg SS) en comparación con la composición 7 y el control. Todos los ensilados de césped/trébol inoculados tuvieron un recuento de levadura y moho inferior (log UFC/g) en comparación con el control.

[0062] Como se puede observar en la figura 8, la exposición aeróbica de 10 días dio como resultado un ascenso de la temperatura del ensilado no inoculado por encima de 3°C sobre la temperatura ambiente después de 91 horas, mientras que la composición 7 fue por encima de 3°C sobre la temperatura ambiente después de 169 horas. La composición 4 fue por encima de 3°C después de 191 horas y la composición 2 alcanzó el mismo aumento después de 214 horas. Después de 240 horas de exposición aeróbica el pH del control fue tan alto como 7,93, mientras que el pH de la composición 7 fue 5,41, el pH de la composición 4 fue 5,35, y el pH de la composición 2 fue el más bajo con un valor de pH de 4,93.

Tabla 6

|                                                                                                                                  |         |                               |                               |                    |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Efecto de varias composiciones en las variables de fermentación y composición microbiana de trébol rojo:timotea:festuca ensilado |         |                               |                               |                    |                               |
| Tratamiento                                                                                                                      | Control | Composición 2<br>(porcentaje) | Composición 4<br>(porcentaje) |                    | Composición 7<br>(porcentaje) |
| <i>L. buchneri</i> DSM 22501                                                                                                     |         | 100                           | 50                            |                    | 50                            |
| <i>L. lactis</i> DSM 11037                                                                                                       |         |                               | 50                            |                    |                               |
| <i>E. faecium</i> DSM 22502                                                                                                      |         |                               |                               |                    | 30                            |
| <i>L. plantarum</i> DSM 16568                                                                                                    |         |                               |                               |                    | 20                            |
| Medición después de 3 días de fermentación anaeróbica                                                                            |         |                               |                               |                    |                               |
| pH después de 3 días                                                                                                             |         | 4,75 <sup>a</sup>             | 4,39 <sup>b</sup>             | 4,40 <sup>b</sup>  | 4,34 <sup>c</sup>             |
| Medición después de 90 días de fermentación anaeróbica                                                                           |         |                               |                               |                    |                               |
| pH después de 90 días                                                                                                            |         | 4,38 <sup>a</sup>             | 4,20 <sup>b</sup>             | 4,17 <sup>b</sup>  | 4,12 <sup>c</sup>             |
| SS, %/kg desiledt                                                                                                                |         | 30,49 <sup>a</sup>            | 31,19 <sup>b</sup>            | 31,45 <sup>b</sup> | 31,64 <sup>c</sup>            |

| Efecto de varias composiciones en las variables de fermentación y composición microbiana de trébol rojo:timotea:festuca ensilado                                                  |         |                               |                               |                               |                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Tratamiento                                                                                                                                                                       | Control | Composición 2<br>(porcentaje) | Composición 4<br>(porcentaje) | Composición 7<br>(porcentaje) |                     |
| Pérdida de SS, %/kg                                                                                                                                                               |         | 7,90 <sup>a</sup>             | 6,20 <sup>b</sup>             | 4,94 <sup>c</sup>             | 4,23 <sup>c</sup>   |
| Fracción N-NH <sub>3</sub> , %/kg N total                                                                                                                                         |         | 5,38 <sup>a</sup>             | 4,05 <sup>b</sup>             | 3,79 <sup>b</sup>             | 3,57 <sup>c</sup>   |
| Ácido láctico, %/kg SS                                                                                                                                                            |         | 4,55 <sup>a</sup>             | 6,28 <sup>c</sup>             | 5,34 <sup>b</sup>             | 5,89 <sup>c</sup>   |
| Ácido acético, %/kg SS                                                                                                                                                            |         | 2,42 <sup>a</sup>             | 2,38 <sup>b</sup>             | 3,59 <sup>b</sup>             | 2,01 <sup>c</sup>   |
| Ácido butírico, %/kg SS                                                                                                                                                           |         | 0,24 <sup>a</sup>             | 0,01 <sup>b</sup>             | 0,02 <sup>b</sup>             | 0,01 <sup>b</sup>   |
| Ácido propiónico, %/kg SS                                                                                                                                                         |         | 0,02 <sup>a</sup>             | 0,02 <sup>c</sup>             | 0,03 <sup>a</sup>             | 0,02 <sup>a</sup>   |
| Alcoholes, %/kg SS                                                                                                                                                                |         | 0,94 <sup>a</sup>             | 0,71 <sup>c</sup>             | 0,82 <sup>b</sup>             | 0,69 <sup>c</sup>   |
| Levadura (log UFC/g)                                                                                                                                                              |         | 3,21 <sup>a</sup>             | 1,00 <sup>b</sup>             | 1,16 <sup>b</sup>             | 1,65 <sup>c</sup>   |
| Mohos (log UFC/g)                                                                                                                                                                 |         | 3,03 <sup>a</sup>             | 1,00 <sup>b</sup>             | 1,32 <sup>c</sup>             | 1,34 <sup>c</sup>   |
| Medición después de 10 días de exposición aeróbica                                                                                                                                |         |                               |                               |                               |                     |
| pH después de test de estabilidad aeróbica                                                                                                                                        |         | 7,93 <sup>a</sup>             | 4,93 <sup>b</sup>             | 5,35 <sup>c</sup>             | 5,41 <sup>c</sup>   |
| Estabilidad aeróbica, horas                                                                                                                                                       |         | 91,20 <sup>a</sup>            | 213,60 <sup>b</sup>           | 190,8 <sup>c</sup>            | 169,20 <sup>c</sup> |
| Letras diferentes en una fila muestran diferencia estadísticamente significativa (P<0,05)<br>No hubo ningún efluente al abrir el silo<br>†Sustancia seca corregida para volátiles |         |                               |                               |                               |                     |

## Discusión

- 5 [0063] El ácido acético producido por *L. buchneri* se conoce por ser un ácido importante para combatir el crecimiento de cepas deterioradoras aeróbicas en la entrega de piensos, donde el ensilado es expuesto al oxígeno. Sin embargo, el crecimiento de *L. buchneri* tiene un tiempo de retardo largo y la reducción de pH usando *L. buchneri* es muy lenta. Esto es bien conocido y por lo tanto la inoculación de *L. buchneri* se combina frecuentemente con unas especies bacterianas de alta producción de ácido láctico (por ejemplo *L. plantarum*). La combinación de cepas de alta producción de ácido láctico puede, sin embargo, contrarrestar la eficiencia de *L. buchneri* en la estabilidad aeróbica. Esto se mostró en el
- 10 mini silo 2 (figura 4), donde la composición 5, que contiene 70% de *L. buchneri* DSM 22501 y 10% de *L. plantarum* DSM 16568, 20% de *L. lactis* DSM 11037, dio como resultado un ensilado mucho menos estable en comparación con la composición 4, que contenía solo una cepa de baja producción de ácido láctico (50% de *L. lactis* DSM 11037) combinada con *L. buchneri* DSM 22501 (50%).
- 15 [0064] El nivel de pH final rápido, pero alto de la composición 4 en comparación con otras combinaciones con especies de producción alta de ácido láctico, parecía tener la ventaja de que *L. buchneri* DSM 22501 era aún capaz de continuar con el crecimiento o ser activo metabólico, lo que fue indicado por un nivel de ácido acético alto (figura 1c). La proporción de ácido acético/ácido láctico alta de la composición 4 se pudo mostrar también en el mini silo 1 (figura 3).
- 20 [0065] La proporción de ácido acético/ácido láctico alta en una fase temprana de fermentación anaeróbica aparentemente tuvo un efecto positivo en la estabilidad aeróbica en el mini silo 3, que se abrió después de solo un periodo corto (2 semanas) de fermentación anaeróbica.
- 25 [0066] Se mostró que la pérdida de SS, un parámetro de calidad de forraje importante, fue tan baja para la composición 4 como para los productos que contenían cepas de alta producción de ácido láctico (mini silo 4 y mini silo 5). Simultáneamente, se consiguió una producción de ácido acético alta. El nivel de ácido acético alto da como resultado un ensilado muy estable (figuras 4, 5, 6 y 7), que en los tres casos con mini silos (ejemplo 2) fue superior en comparación con otras composiciones con *L. buchneri* DSM 22501 (composiciones 5 y 7) donde *L. plantarum* DSM 16568, una cepa de alta producción de ácido láctico, estaba incluida.
- 30 [0067] Los experimentos actuales por lo tanto muestran que al combinar el *L. buchneri* heterofermentativo facultativo con cepas solo homofermentativas se puede conseguir una buena calidad de forraje y una estabilidad aeróbica mejorada incluso para ensilados abiertos después de solo un periodo corto de fermentación anaeróbica.
- 35 Referencias

[0068]

5 Jatkauskas, J. and V. Vrotniakiene, "Evaluation of fermentation parameters, microbiological composition and aerobic stability of grass and whole crop maize silages treated with microbial inoculants." Zemdirbyste-Agriculture., 2013, Vol. 100, No. 2, pp. 143-150

10 Jatkauskas, J. *et al.* (2013), The effects of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silages, Agricultural and Food Science, 2013, 22, 137-144

Vandamme, B. *et al.*, Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiological Reviews, 1996, Vol. 60, No. 2, 407-438

**REIVINDICACIONES**

1. Inoculante de ensilado que como componentes activos solo comprende:
  - 5       a) bacterias de ácido láctico heterofermentativas obligatorias de las especies *Lactobacillus buchneri* y
  - b) bacterias homofermentativas de al menos una de las especies *Lactococcus* y *Enterococcus* que no reducen el crecimiento de a).
2. Inoculante de ensilado según la reivindicación 1 que solo comprende un *Lactobacillus buchneri* y un *Lactococcus*.
- 10   3. Inoculante de ensilado según la reivindicación 1 o 2 donde el *Lactococcus* es un *Lactococcus lactis*.
4. Inoculante de ensilado según la reivindicación 3 donde el *Lactococcus lactis* es la cepa depositada como DSM 11037.
- 15   5. Inoculante de ensilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el *Lactobacillus buchneri* es el *Lactobacillus buchneri* depositado como DSM 22501.
6. Inoculante de ensilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5 donde el *Enterococcus* es un *Enterococcus faecium*.
- 20   7. Método para la producción de un producto de pienso fermentado, dicho método comprende la inoculación de un material vegetal con el inoculante de ensilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Método según la reivindicación 7 donde el material vegetal ha sido incubado con el inoculante de ensilado durante un periodo de hasta 4 días.
- 25   9. Método según la reivindicación 7 donde el material vegetal ha sido incubado con el inoculante de ensilado durante un periodo de hasta 7 días.
10. Método según la reivindicación 7 donde el material vegetal ha sido incubado con el inoculante de ensilado durante un periodo de hasta 14 días.
- 30   11. Método según la reivindicación 7 donde el material vegetal ha sido incubado con el inoculante de ensilado durante un periodo de hasta 28 días.
- 35   12. Método según la reivindicación 7 donde el material vegetal ha sido incubado con el inoculante de ensilado durante un periodo de al menos 90 días.

Figura 1a

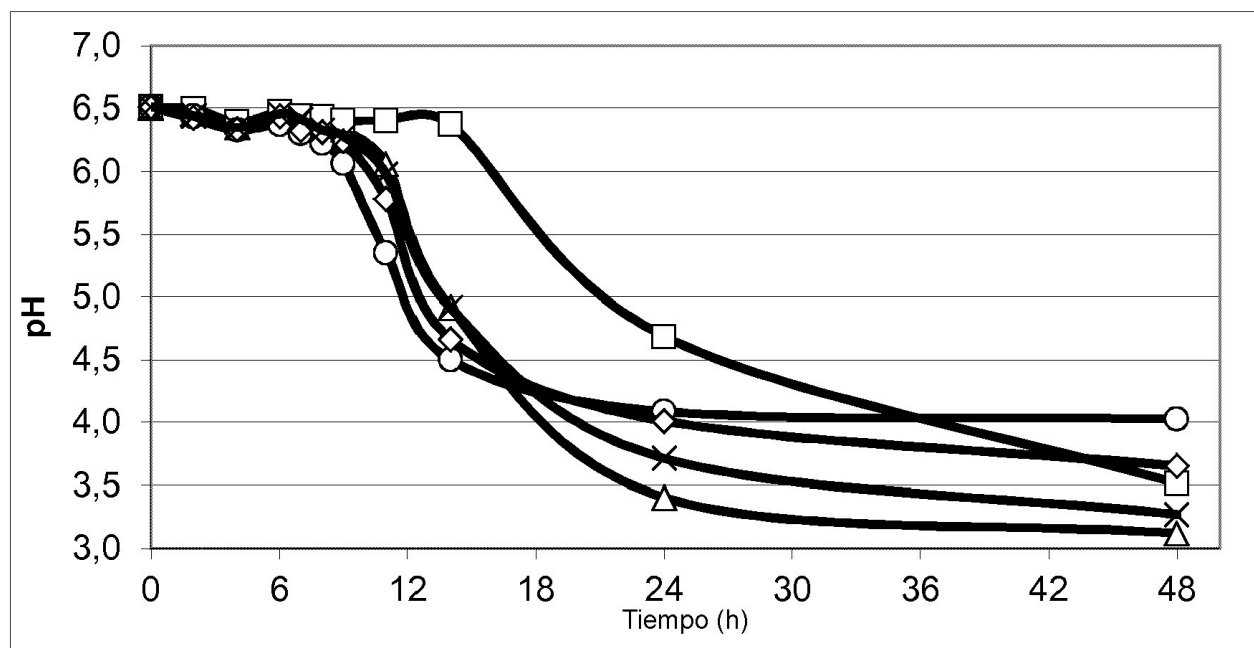




Figura 1b

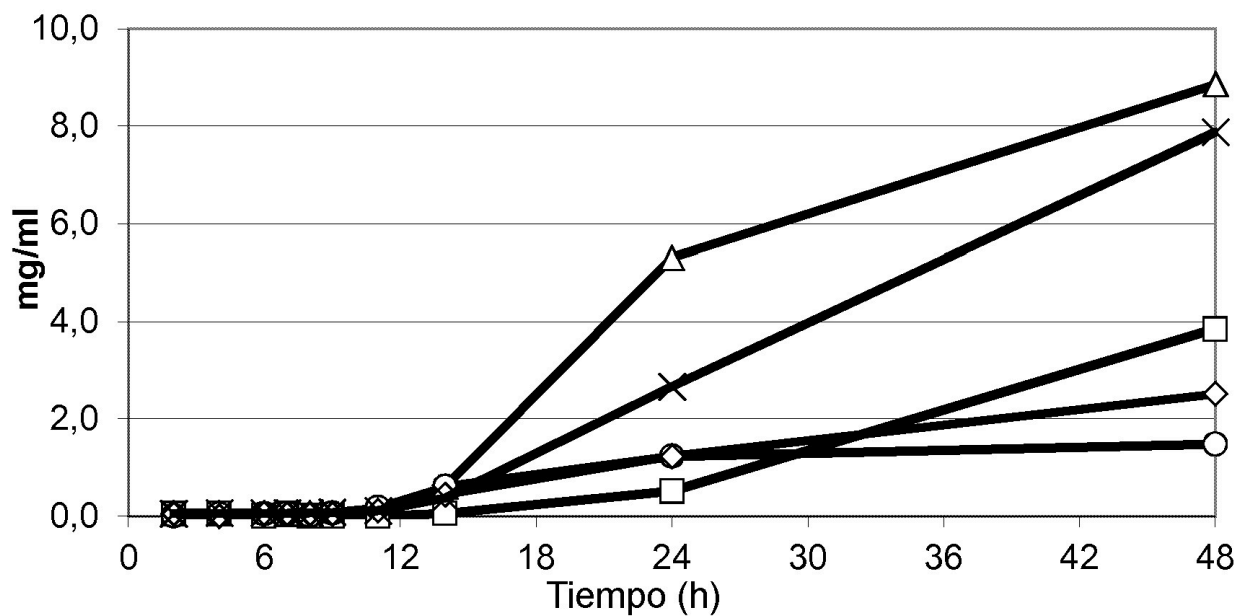


Figura 1c

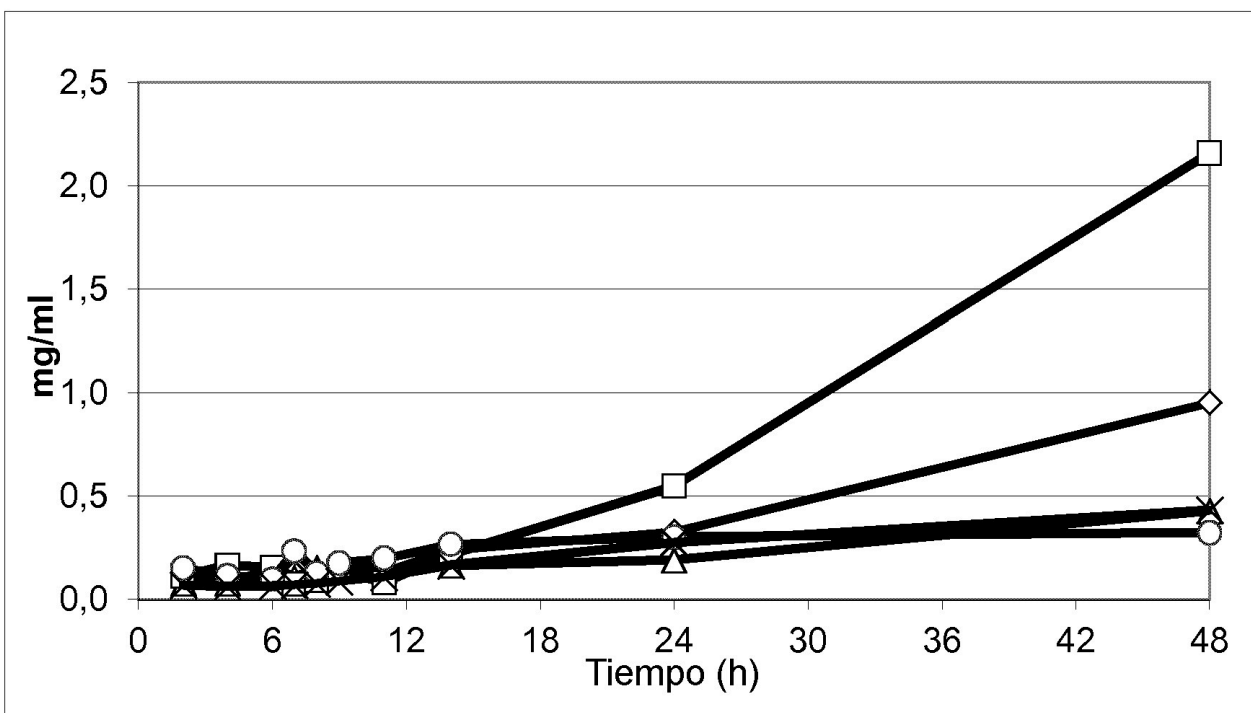


Figura 2

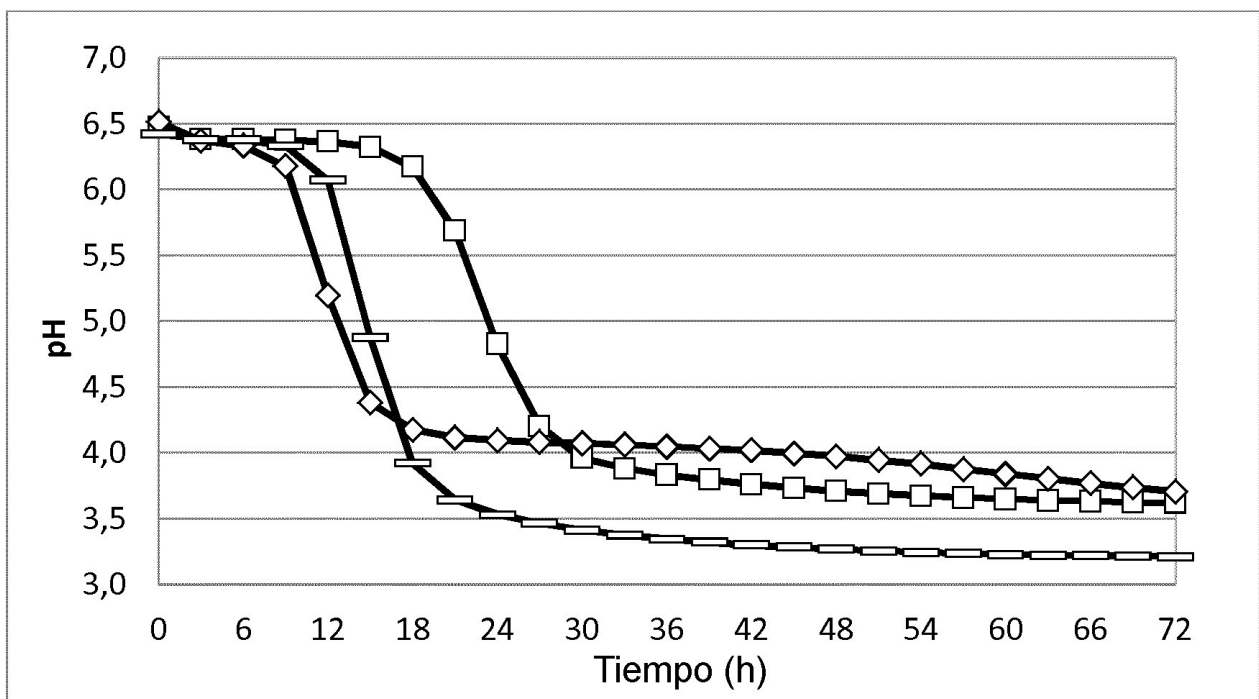


Figura 3

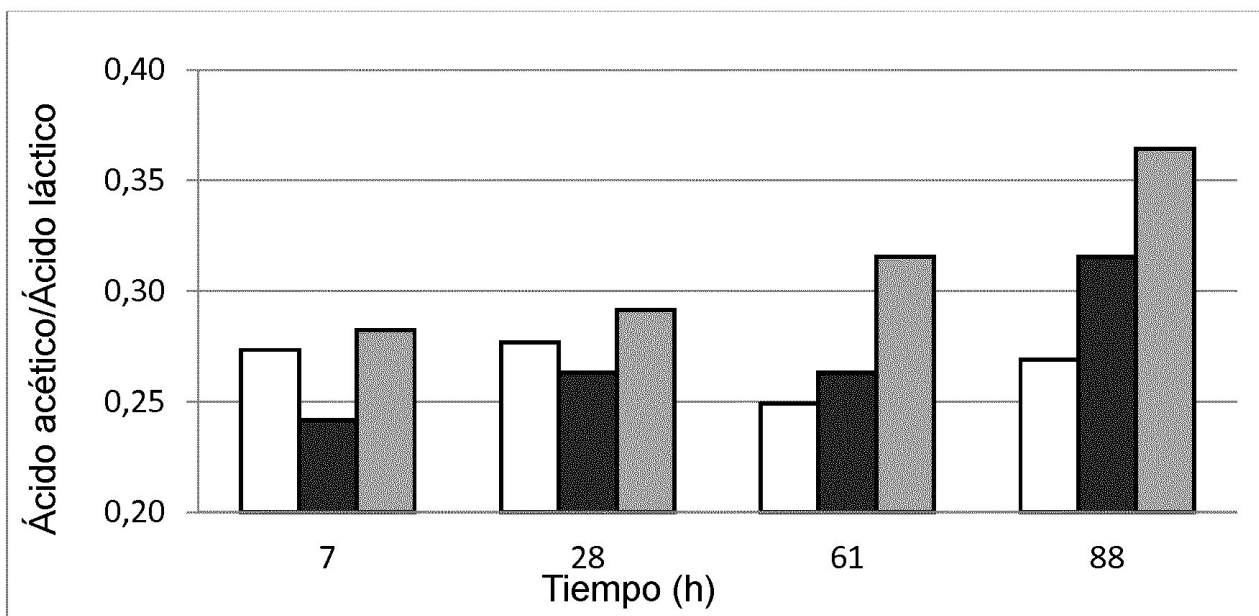


Figura 4

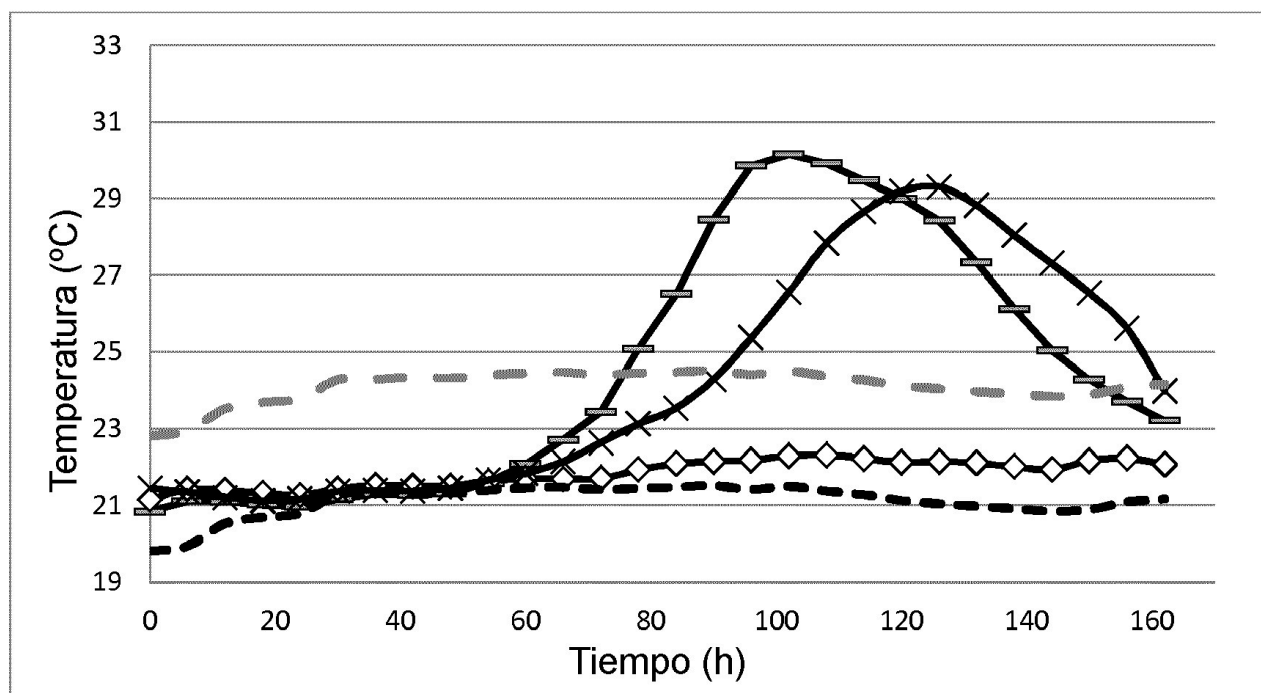


Figura 5

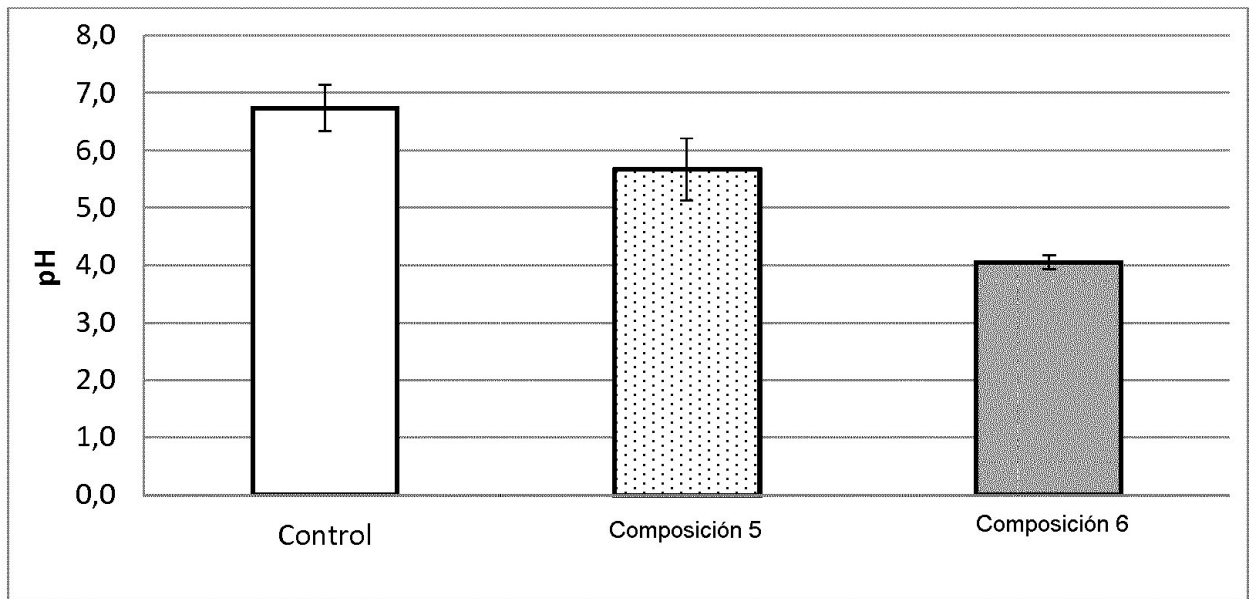


Figura 6

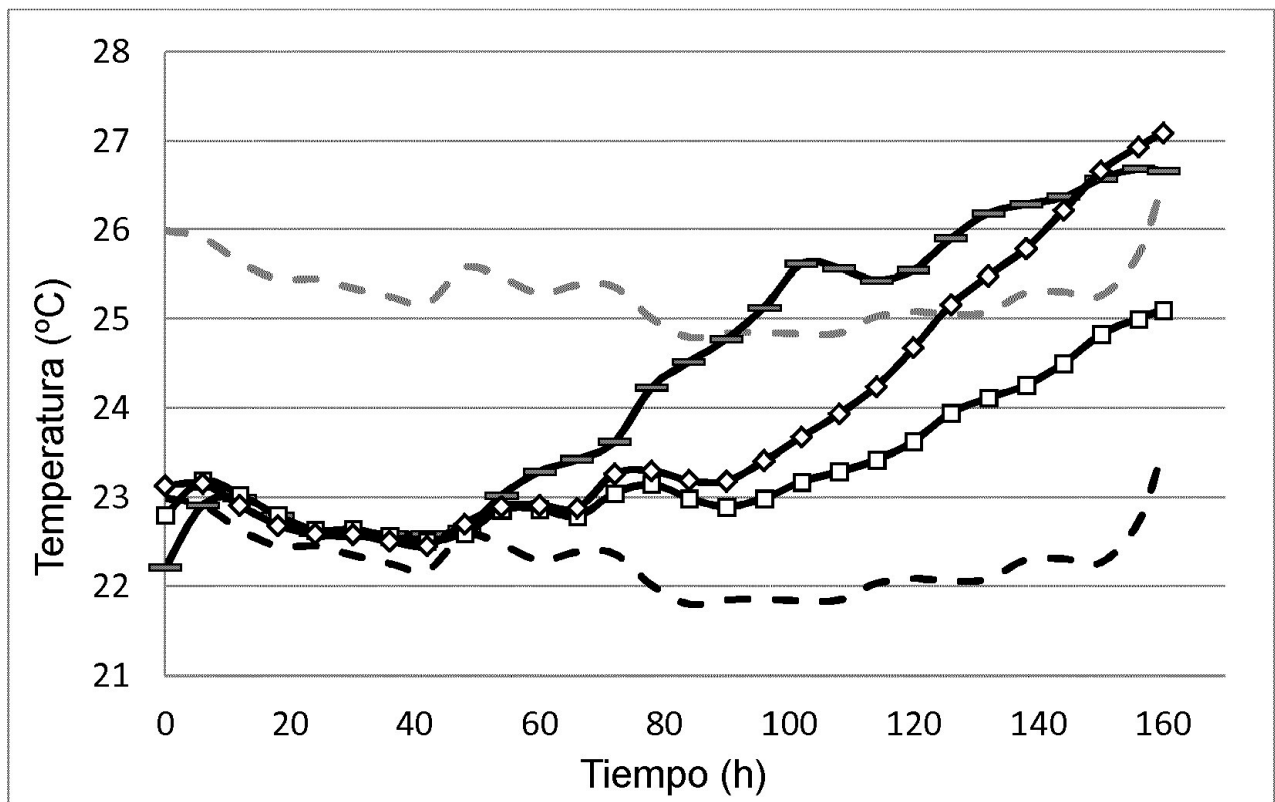


Figura 7

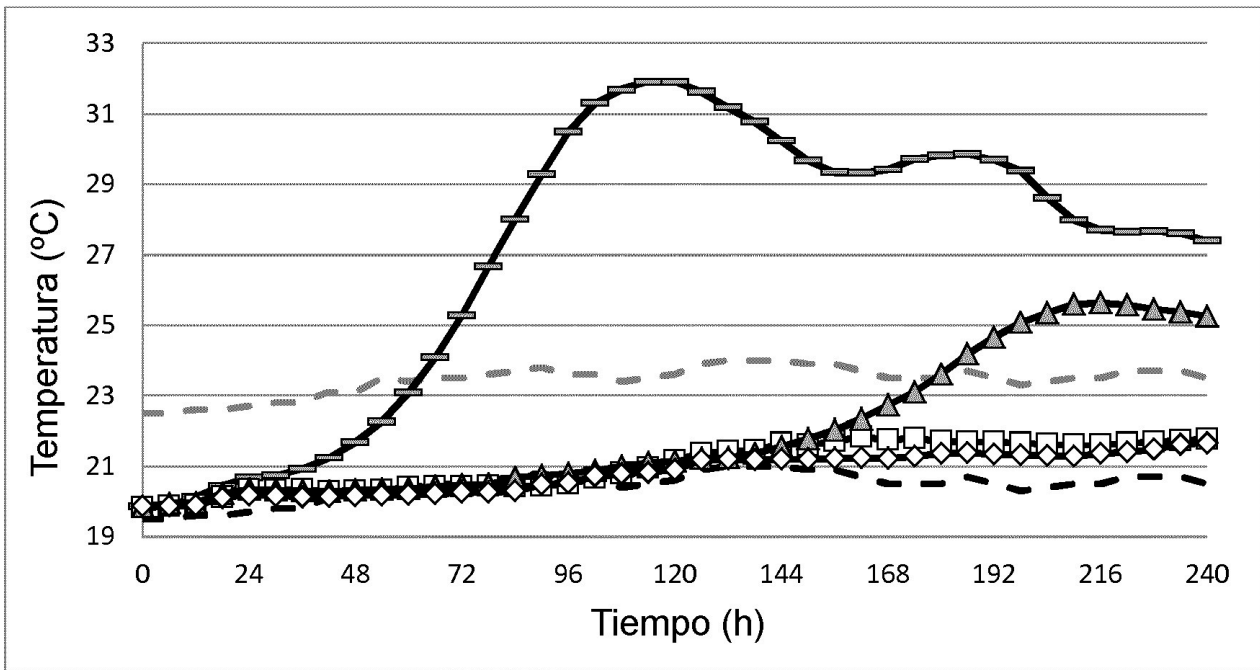


Figura 8

