

РАЗРАБОТКА СУХОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ СИЛОСОВАНИЯ С ОПТИМАЛЬНЫМ СООТНОШЕНИЕМ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ КУЛЬТУР

М.А. Карташов¹, Т.М. Воинова¹, А.В. Сергеева¹, Н.В. Стацюк¹,
С.В. Роговский¹, Я.О. Гребенева¹, Д.А. Дурников²

¹ООО «Фермлаб», Москва, Россия, E-mail: fermlab@mail.ru, tatiana.voinova@bk.ru, allsergeeva@mail.ru,
engbio@rambler.ru, latessad@mail.ru, yanagrebeneva@yandex.ru

²Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия, E-mail: durnikin@mail.ru

Силос, являющийся основным кормом для крупного рогатого скота в зимний период, требует применения консервантов, обеспечивающих сохранение его качества. Использование биоконсервантов на бактериальной основе улучшает поедаемость силоса и продуктивность сельскохозяйственных животных. Многокомпонентные биоконсерванты, содержащие молочнокислые и пропионовокислые бактерии, способны улучшать органолептические свойства и сохранность силоса, особенно его аэробную стабильность. В данном исследовании была отработана технология получения сухих бактериальных препаратов ранее разработанных штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723, обладающих хозяйственно ценными признаками. Определены оптимальные режимы концентрирования культуральных жидкостей штаммов и их лиофилизации, позволяющие минимизировать потери биомассы и получать сухие препараты с содержанием жизнеспособных клеток не менее $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл. Оптимальная скорость протока при проточном центрифугировании составила 130 л/ч, а температура и срок предварительного замораживания перед лиофилизацией – 8 ч при -35 – -40°C или 12–14 ч при -25°C . Анализ влияния различных соотношений используемых штаммов в конечном препарате на ряд показателей качества кукурузного силоса позволил подобрать оптимальную пропорцию штаммов *L. plantarum* ВКПМ В-4173, *L. lactis* ВКПМ В-2092 и *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723, равную 2 : 2 : 1, соответственно. Применение бактериальной закваски, содержащей бактериальные компоненты в указанной пропорции, обеспечивает сохранение в силосе на 60-й день хранения достоверно максимального содержания белка (94% от исходного уровня), а также максимального количества органических кислот (2,9%). Содержание в этом варианте молочной и уксусной кислот составило 69,4 и 31,1% от общего содержания органических кислот, соответственно. Кроме того, данная пропорция обеспечила достоверно наименьшее содержание в силосе аммиака (125 ± 5 ppm или 61,6% от контроля). На основании полученных результатов, авторы считают возможным рекомендовать к использованию разрабатываемый биоконсервант для улучшения качества силосных кормов.

Ключевые слова: силос, биологический консервант, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Propionibacterium acidipropionici*, органические кислоты, аммиак

Citation:

M.A. Kartashov, Voinova, T.M., Sergeeva, A.V., Statsyuk, N.V., Rogovsky, S.V., Grebeneva, Ya.O., Durnikin, D.A. (2016). Development of a lyophilized bacterial preparation for silaging with the optimum proportion of lactic acid and propionic acid bacteria. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6 (3), 219–228.

Поступило в редакцию / Submitted: 12.11.2016

Принято к публикации / Accepted: 01.12.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201689>

© **Kartashov¹, Voinova, Sergeeva, Statsyuk, Rogovsky, Grebeneva, Durnikin, 2016**

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

DEVELOPMENT OF A LIOPHYLIZED BACTERIAL PREPARATION FOR SILAGING WITH THE OPTIMUM PROPORTION OF LACTIC ACID AND PROPIONIC ACID BACTERIAM.A. Kartashov¹, T.M. Voinova¹, A.V. Sergeeva¹, N.V. Statsyuk¹, S.V. Rogovsky¹,
Ya.O. Grebeneva¹, D.A. Durnikin²¹ *FermLab LLC, Moscow, Russia, E-mail: fermlab@mail.ru, tatiana.voinova@bk.ru, allsergeeva@mail.ru, engbio@rambler.ru, latessad@mail.ru, yanagrebeneva@yandex.ru*² *Altai State University, Barnaul, Russia, E-mail: durnikin@mail.ru*

Silage represents the main forage for agricultural animals during a winter period and requires the use of preservatives providing the maintenance of its quality. The use of microbial biopreservatives improves the silage consumption and productivity of animals. Multicomponent biopreservatives containing lactic acid and propionic acid bacteria are able to significantly improve organoleptic qualities and preservation of silage, especially its aerobic stability. In this study, the technology of production of liophylized bacterial preparations of earlier developed *Lactobacillus plantarum* VKPM B-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* VKPM B-2092, and *Propionibacterium acidipropionici* VKPM B-5723 strains, characterized by valuable traits, has been developed. The optimum modes of the culture broth concentration and freeze-drying have been developed, which provide the minimization of biomass losses and obtaining of dry preparations containing at least $1 \cdot 10^{11}$ CFU/mL of viable cells. The optimum flow rate for the streaming centrifuging was 130 L/h, and the optimum temperature and duration of a preliminary freezing before the freeze-drying were 8 h at -35 - 40°C or 12-14 h at -25°C . The analysis of the effect of different proportions of the used strains in the final preparation on some qualitative characteristics of silage made it possible to determine the optimal proportion of *L. plantarum* VKPM B-4173, *L. lactis* VKPM B-2092, and *P. acidipropionici* VKPM B-5723 strains equal to 2 : 2 : 1, respectively. The use of such biopreservative provides the maintenance of the maximum protein content (94% of the initial level) and the maximum content of total organic acids (2.9%) in the corn silage at the 60th day of storage. In this case, the content of lactic and acetic acids was equal to 69.4 and 31.1% of the total organic acid content, respectively. In addition, this proportion provided the minimum ammonium content in the silage (125 ± 5 ppm or 61.6% of the control). Based on the obtained results, authors recommend to use the developed biopreservative for the improvement of the silage quality.

Key words: silage, biopreservative, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Propionibacterium acidipropionici, organic acids, ammonium

Силос, наряду с сенажом, является основным кормом для крупного рогатого скота в зимний период; его удельный вес в рационах достигает 50% и более (Левахин и др., 2012). Введение в зимний рацион силосованных кормов обеспечивает более полноценное кормление, а также позволяет максимально приблизить зимний тип кормления к летнему и повысить продуктивность животных.

При заготовке сочных кормов всегда существует опасность их контаминации плесневыми или дрожжевыми грибами, что в итоге может привести к существенным потерям конечного продукта и/или его заражению микотоксинами. Наиболее рациональным способом избежать этого является создание условий, предотвращающих развитие нежелательной микрофлоры. Физические методы консервации, такие как сушка, охлаждение, заморозка и пр. применяются обычно для защиты пищевых продуктов, но не фуража, для которого используются химические и биологические методы защиты. К наиболее распространенному химическому способу консервации относится обработка заготавливаемых кормов слабыми органическими кислотами – уксусной, молочной, пропионовой, сорбиновой или бензойной (Brul and Coote, 1999). Однако химические консерванты обладают рядом недостатков (высокая стоимость, экологическая небезопасность, ухудшение органолептических характеристик, агрессивное воздействие на персонал), и в некоторых случаях их применение законодательно ограничено (Brul and Coote, 1999); кроме того, известно, что некоторые грибы способны вырабатывать устойчивость к действию таких консервантов как, например, сорбиновая и бензойная кислоты (Loureiro and Querol, 1999; Davidson, 2001).

В противоположность химическим консервантам, применение биоконсервантов обычно не вызывает нареканий у потребителя и законодательства, поскольку используемые для этого бактерии, как правило, присутствуют в естественной микрофлоре заготовленного корма, либо добавляются туда в виде чистых культур или консорциумов, и считаются безвредными для живых организмов. Вплоть до начала 90-х гг. биоконсерванты оставались непопулярными среди сельскохозяйственных производителей, отдававших предпочтение химическим препаратам как консервантам с предсказуемой эффективностью (Davies, 2010). Однако технологии, связанные с микробными препаратами, постепенно совершенствовались, что способствовало постепенному вытеснению спроса на химические консерванты, тем более что использование биоконсервантов способствует увеличению питательной ценности силоса.

Вплоть до середины девяностых годов в качестве биоконсервантов использовали главным образом гомоферментные виды МКБ, продуцирующие преимущественно молочную кислоту, такие как *Lactobacillus plantarum*, а также различные виды *Pediococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus* (Yitbarek et al., 2014). Гомоферментные МКБ достаточно быстро нарабатывают большое количество молочной кислоты, однако иногда неспособны обеспечить стабильность качества силоса при открытом доступе воздуха, поскольку производят недостаточное количество антигрибковых компонентов, таких как уксусная кислота (Weinberg et al., 1993; Ranjit et al., 2000). Кроме того, в результате их активности образуется большое количество

водорастворимых углеводов и лактата, служащих субстратом для дрожжей и плесневых грибов (Huisden et al., 2009). В то же время гетероферментные МКБ, такие как *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis* и др., обладая меньшей эффективностью в части сохранения питательных веществ в силосе, способны улучшать сохранность силоса в аэробных условиях (Holzer et al., 2003). Гетероферментные МКБ, как правило, доминируют в нативной флоре силоса (Garzia and Giovanna, 1984), хотя на первых этапах ферментации основную роль играют гомоферментные лактобактерии. Однако следует отметить, что использование в качестве закваски исключительно гетероферментных бактерий увеличивает потери сухой массы силоса во время ферментации, что, возможно, вызвано более сильным снижением pH; кроме того, силос с повышенным содержанием уксусной кислоты обладает более низкими вкусовыми качествами (Addah et al., 2012).

Помимо МКБ для увеличения аэробной стабильности силоса могут применяться и пропионовокислые бактерии (ПКБ), способные преобразовывать молочную кислоту и глюкозу в уксусную и пропионовую кислоты, обладающие более выраженным противогрибковым и противодрожжевым эффектом, чем молочная кислота. Так, добавление *Propionibacterium shermanii* в кукурузный силос высокой влажности обеспечивало существенное подавление развития дрожжевых грибков даже при начальном pH выше 4.5 (Flores-Galaraza et al., 1985). Обработка силоса *P. acidipropionici* обеспечивала увеличение его аэробной стабильности на 24-72 ч по сравнению с необработанным силосом или силосом, обработанным МКБ (Bolsen et al., 1996). Кроме того, было показано, что некоторые метаболиты ПКБ оказывают положительное влияние на рост МКБ, а сами МКБ и ПКБ благоприятно действуют друг на друга (Parker et al., 1982). Таким образом, ПКБ могут служить полезным дополнением к гомо- и гетероферментным МКБ, обеспечивающим антимикробный эффект.

В настоящее время высокоэффективные многокомпонентные биоконсерванты, состоящие из гомо- и гетероферментных МКБ, а также ПКБ, набирают популярность, о чем свидетельствуют многочисленные публикации и патенты (см., например, Benfeldt, 2015; Балпанов и др., 2014; Queiroz et al., 2012). Кроме того, активно исследуется направление, связанное с добавлением в биоконсерванты ферментативных препаратов, способных расщеплять сложные углеводы, повышая питательную ценность кормов и, следовательно, продуктивность животных (Jones and Morse, 2013; Ni et al., 2014; Romero et al., 2015). Поскольку стоимость ферментных препаратов достаточно высока, многие исследователи занимаются также поиском или созданием штаммов МКБ, обладающих гидролазной активностью (Donaghy et al., 1998; Rossi et al., 2001; Ozkoze et al., 2009; Morais et al., 2013).

В проведенных ранее исследованиях авторы, поставившие перед собой задачу разработки высокоэффективного биоконсерванта на основе консорциума МКБ и ПКБ, проявляющего гидролазную активность, сумели получить методом культивирования на селективной среде мутантный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092, отличающийся высокой скоростью роста и повышенным накоплением низина А (~ 9000 ед/мл), антибиотика, используемого во многих странах в качестве безопасного антибактериального агента (Sergeeva et al., under review). Методом индуцированного мутагенеза был получен штамм *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 с повышенной устойчивостью к пропионовой кислоте (до 10 г/л; Карташов и др., 2016). Кроме того, был разработан биоинженерный штамм *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, обладающий гликозил-гидролазной активностью, а также отработаны методики культивирования всех трех штаммов.

Целью настоящего исследования являлась разработка технологии получения сухого препарата биоконсерванта на основе полученных нами культур МКБ и ПКБ и подбор их оптимального соотношения в препарате.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлись штаммы бактерий *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723. Штаммы культивировали в биореакторах емкостью 100 л (ООО «Профсплав», Россия) в условиях контролируемого pH.

Среды для культивирования штамма *L. plantarum* ВКПМ В-4173:

а) посевная среда (г/л): меласса - 20,0; кукурузный экстракт - 5,0; дрожжевой экстракт - 5,0; сульфат железа (II) - 0,05; сульфат марганца - 0,05; гидрофосфат калия - 2,0; ацетат натрия - 5,0; мел - 0,5; лапзол - 2,2 мл/л (pH 7,1).

б) ферментационная среда (г/л): меласса - 20,0; глюкоза - 20,0; кукурузный экстракт - 5,0; дрожжевой экстракт - 3,0; сульфат железа (II) - 0,05; сульфат марганца - 0,05; гидрофосфат калия - 2,0; ацетат натрия - 5,0; мел - 0,5; лапзол - 2,2 мл/л (pH 7,1).

Среды для культивирования штамма *L. lactis* ВКПМ В-2092:

а) посевная среда (г/л): лактоза - 20,0; кукурузный экстракт - 10,0; дрожжевой экстракт - 5,0; пептон мясной - 5,0; сульфат магния - 2,0; мел - 5,0; гидроортофосфат калия - 2,0; лапзол - 2,2 (pH 7,1).

б) ферментационная среда (г/л): лактоза – 30,0; кукурузный экстракт – 25,0; дрожжевой экстракт – 5; пептон мясной – 5,0; сульфат магния – 2,0; мел – 5,0; гидроортофосфат калия – 2,0; лапзол – 0,5 (рН 6,9).

Для культивирования штамма *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723 использовали посевную и ферментационную среды одинакового состава (г/л): меласса – 10,0; кукурузный экстракт – 20,0; лактоза – 0,5; сульфат аммония – 0,5; гидроортофосфат калия – 0,2; лапзол – 2,2 (рН 7,3).

Условия культивирования использованных в исследовании штаммов приведены в таблице 1. Для всех трех штаммов доза инокулята составляла 8-10%.

Таблица 1. Условия культивирования штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723

Параметры культивирования	<i>Lactobacillus plantarum</i> ВКПМ В-4173	<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ В-2092	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ВКПМ В-5723
Температура ферментации, °С	29±1	37±1	29±1
рН в начале ферментации	6,8-7,0	6,8-7,0	6,8-7,0
рН в конце процесса	≥ 4,5	≥ 4,5	≥ 4,7
Аэрация	без доступа воздуха	без доступа воздуха	без доступа воздуха
Перемешивание	постоянное	минимальные об/мин	постоянное
Избыточное давление в аппарате	0,05-0,07 МПа	0,05-0,07 МПа	0,05-0,07 МПа
Время ферментации	20-22 ч	18 ч	18-20 ч

После завершения ферментации, культуральные жидкости концентрировали методом центрифугирования с использованием высокоскоростной проточной центрифуги J-1250 (Hanil Science Industrial Co., Ltd.) при различных скоростях протока. Для отработки режима концентрирования всех трех культур использовали культуральную жидкость штамма *L. lactis* ВКПМ В-2092 с содержанием жизнеспособных клеток $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Определение содержания жизнеспособных клеток проводили путем посева соответствующих разведений пробы на твердую агаризованную среду MRS (Multon, 1996). Сухую биомассу культур получали методом лиофилизации с использованием сублимационной сушильной установки TG-50 (HVD HochVakuumtechnik Dresden GMBH, Германия) при различных режимах предварительного замораживания; лиофилизацию проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Концентраты бактериальных культур предварительно смешивали в соотношении 1:1 с криопротекторной средой (аскорбиновая кислота – 52,5 г/л; молоко сухое обезжиренное – 262,5 г/л; рН 7,0).

Смешивание сухих препаратов бактерий проводили в различных пропорциях. Всего было проанализировано четыре варианта (Таблица 2). Конечное общее содержание бактерий в лиофилизатах составляло 10^{11} КОЕ/г; в качестве вспомогательного вещества для нормализации титра использовали сухую молочную сыворотку.

Таблица 2. Варианты состава биоконсерванта, использованные в исследовании

Вариант	Количество частей сухого препарата микроорганизма:		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ВКПМ В-4173	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ВКПМ В-2092	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ВКПМ В-5723
1	1	1	1
2	2	2	1
3	3	3	1
4	4	4	1

Силосование проводили в лабораторных условиях в герметично закрывающихся стеклянных сосудах ($n = 3$), в которые плотно утрамбовывали по 250 г измельченной зеленой массы кукурузы. Перед силосованием растительный материал автоклавировали, затем увлажняли до 65-70%. Количество вносимого консерванта было рассчитано, исходя из соотношения 2,0 г на 1 т зеленой массы; в контрольном варианте консервант не добавляли. Продолжительность силосования составила 60 дней.

Химический состав заложенных силосов анализировали с применением стандартных методов химического анализа (Практикум..., 2012). Содержание аммиака, органических кислот и уровень рН

определяли согласно ГОСТ 23638-90. Биометрическая и статистическая обработка полученных в опытах данных была проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования были подобраны оптимальные режимы концентрирования и лиофилизации бактериальных культур.

Результаты тестирования различных режимов концентрирования бактериальных культур приведены в табл. 3. Согласно полученным данным, единичные клетки бактерий обнаруживались уже при скорости протока 130 л/ч. При дальнейшем увеличении скорости потока возникала мутность нативного раствора, и нарастало количество клеток в нем. Хорошее разделение культуральной жидкости было отмечено на скоростях протока 100-120 л/ч, однако из соображений повышения производительности в качестве оптимальной скорости был выбран уровень 130 л/ч; при этом содержание жизнеспособных клеток в концентрате составило $(8,0 \pm 0,4) \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл, а влажность препарата – 70%.

Таблица 3. Характеристика нативного раствора при различных скоростях протока культуральной жидкости через проточную центрифугу

Скорость протока, л/ч	Прозрачность раствора, визуально	Количество клеток в растворе, КОЕ/мл
80	прозрачный	-
100	прозрачный	-
120	прозрачный	-
130	прозрачный	16
140	легкая мутность	$2 \cdot 10^3$
150	небольшая мутность	$8 \cdot 10^4$

Технология лиофильной сушки предусматривает проведение предварительной заморозки смеси бактериального концентрата с криопротекторной средой. Был проведен эксперимент по определению оптимальной температуры и времени замораживания концентрата бактериальных клеток. В качестве критерия для оценки использовали количество жизнеспособных клеток в лиофилизате, определенное сразу после высушивания. Было проверено несколько вариантов температуры замораживания концентрата в диапазоне от -20 до -40°C с экспозицией 8-14 ч. Результаты эксперимента для концентрата клеток *L. lactis* ВКПМ В-2092 ($8 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл) представлены на рис. 1.

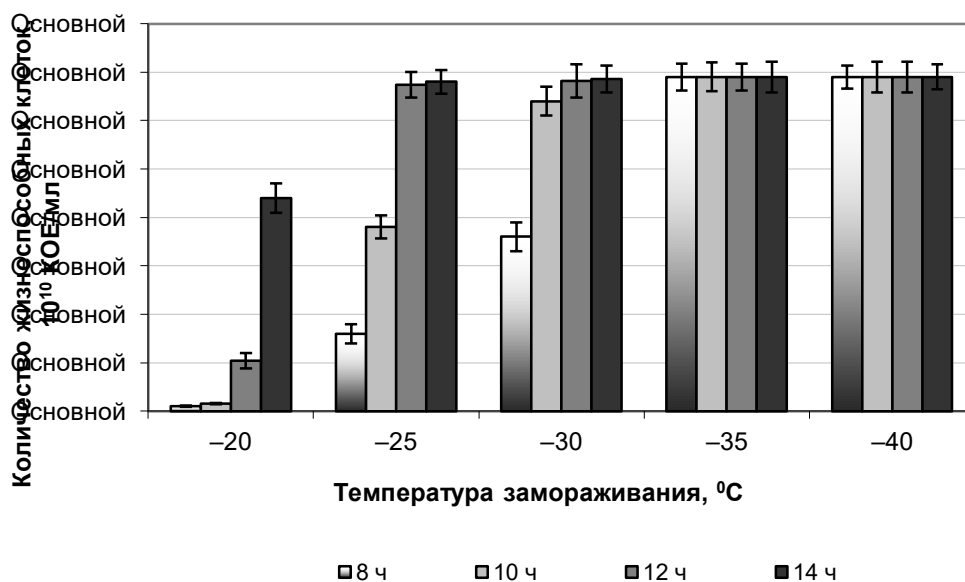


Рис. 1. Выживаемость клеток *L. lactis* ВКПМ В-2092 в процессе лиофилизации в зависимости от температуры и продолжительности предварительного замораживания.

Согласно полученным результатам, наилучшая выживаемость бактериальных клеток при замораживании в течение 8 ч достигается при температуре -35-40°C. Однако достижение максимально низких температур является довольно энергозатратным процессом, и с точки зрения энергоэффективности заслуживает внимания возможность достижения близких к максимальной выживаемости значений при температуре -25°C при увеличении времени замораживания до 12-14 ч.

Эксперименты, проведенные с двумя другими культурами, дали сходные результаты (данные не показаны). Таким образом, оптимальные условия лиофилизации включали два возможных режима предварительного замораживания бактериального концентрата: (1) 8 ч при $-35-40^{\circ}\text{C}$ и (2) 12-14 ч при -25°C . Применение этих условий обеспечивало в дальнейшем (после проведения досушивания лиофилизатов бактериальных концентратов в течение 10 ч при 25°C до остаточной влажности $<4\%$) сохранение жизнеспособности клеток в конечном препарате на уровне не менее 10^{11} КОЕ/мл.

Для определения эффективности внесения нового биологического консерванта в закладываемую зеленую массу растений были проведены предварительные лабораторные испытания. В лабораторных условиях было установлено, что на 60-й день в приготовленном лабораторном силосе, содержалось больше питательных веществ, чем в образцах без консерванта (табл. 4).

Таблица 4. Сохранность питательных веществ в кукурузном силосе, обработанном биоконсервантом с различным соотношением штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 (60-й день закладки, $\text{M} \pm \text{m}$, $n = 3$)*

Показатель	Исходная масса	Вариант опыта (соотношение штаммов ВКПМ В-4173, ВКПМ В-2092, ВКПМ В-5723)				
		контроль	1:1:1	2:2:1	3:3:1	4:4:1
		1	2	3	4	5
Сырой белок	$8,32 \pm 0,20$	$7,12 \pm 0,08$	$7,43 \pm 0,10$	$7,83 \pm 0,14$	$7,72 \pm 0,10$	$7,42 \pm 0,20$
Сырой жир	$2,43 \pm 0,23$	$2,55 \pm 0,23$	$2,63 \pm 0,14$	$2,67 \pm 0,11$	$2,63 \pm 0,13$	$2,65 \pm 0,21$
Сырая клетчатка	$30,0 \pm 0,33$	$35,24 \pm 0,16$	$35,17 \pm 0,17$	$35,12 \pm 0,23$	$35,08 \pm 0,19$	$34,9 \pm 0,23$
Зола	$4,67 \pm 0,13$	$4,79 \pm 0,08$	$4,83 \pm 0,18$	$4,94 \pm 0,12$	$4,97 \pm 0,11$	$4,82 \pm 0,15$
Безазотистые экстрактивные вещества	$54,48 \pm 0,22$	$51,04 \pm 0,12$	$51,18 \pm 0,14$	$50,98 \pm 0,32$	$51,08 \pm 0,21$	$51,48 \pm 0,25$
Сухое вещество	$26,12 \pm 0,15$	$26,33 \pm 0,13$	$26,38 \pm 0,12$	$26,48 \pm 0,12$	$26,44 \pm 0,15$	$26,15 \pm 0,12$

* Все показатели приведены в %.

На 60-й день закладки наиболее высокое содержание белка ($p < 0,05$) было отмечено для вариантов 3 и 4 (94,0 и 92,7% от содержания в исходной массе); превышение по сравнению с контролем (вариант 1) составило 9,5 и 7,2%, соответственно. Наблюдаемое снижение содержания безазотистых экстрактивных веществ в опытных вариантах (5,6–6,6%) можно объяснить более интенсивным использованием сахара в процессе брожения.

Важными факторами, определяющими сохранность корма, являются уровень pH, накопление органических кислот в процессе силосования и их соотношение. Результаты оценки данных параметров для исследованных вариантов соотношения микроорганизмов в биоконсерванте приведены в табл. 5.

Таблица 5. Показатели качества кукурузного силоса, обработанного биоконсервантом с различным соотношением штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 (60-й день закладки, $\text{M} \pm \text{m}$, $n = 3$)

Контролируемые показатели	Вариант опыта (соотношение штаммов ВКПМ В-4173, ВКПМ В-2092, ВКПМ В-5723)				
	Контроль	1:1:1	2:2:1	3:3:1	4:4:1
	1	2	3	4	5
pH	$4,50 \pm 0,10$	$4,10 \pm 0,10$	$4,0 \pm 0,10$	$4,0 \pm 0,20$	$3,90 \pm 0,20$
Общее содержание органических кислот, %	$2,30 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,06$	$2,90 \pm 0,05$	$2,81 \pm 0,04$	$2,80 \pm 0,04$
Содержание молочной кислоты от суммы органических кислот, %	$56,30 \pm 0,40$	$64,90 \pm 0,30$	$69,40 \pm 0,40$	$67,30 \pm 0,20$	$65,60 \pm 0,50$
Содержание уксусной кислоты от суммы органических кислот, %	$43,30 \pm 0,50$	$34,0 \pm 0,30$	$31,10 \pm 0,40$	$32,20 \pm 0,40$	$34,10 \pm 0,30$
Содержание пропионовой кислоты от суммы органических кислот, %	0	$1,0 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,06$
Содержание масляной кислоты от суммы органических кислот, %	$0,40 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,04$	0	0	$0,20 \pm 0,03$

Согласно полученным результатам, во всех экспериментальных вариантах рН силоса на 60-й день закладки был достоверно ниже, чем в контроле. Максимальное общее количество органических кислот было отмечено в варианте 3; этот же вариант показал достоверно наименьшее содержание уксусной кислоты, негативно влияющей на органолептические характеристики силоса, и максимальное содержание молочной кислоты. Масляная кислота, еще один компонент, негативно влияющий на качество силоса, была обнаружена в контроле и в вариантах 2 и 5.

Анализ содержания аммиака показал, что, по сравнению с контролем, все опытные образцы содержали достоверно меньшее его количество (рис. 2). Достоверно наименьшее содержание аммиака (125 ± 5 ppm или 61,6% от контроля) было выявлено в варианте 3.

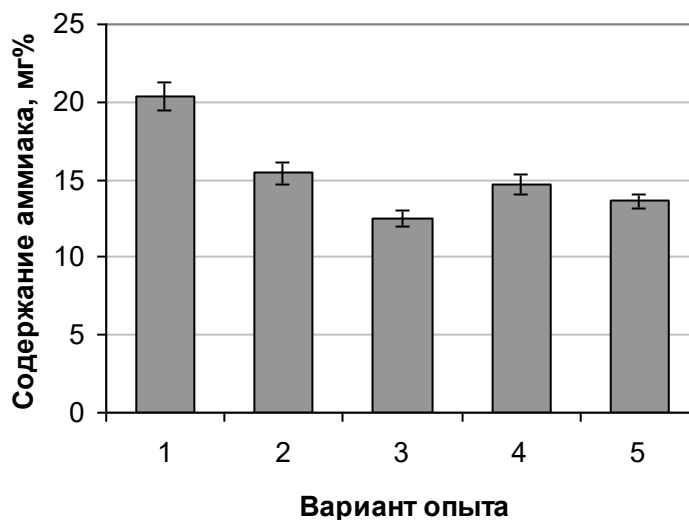


Рис. 2. Содержание аммиака в кукурузном силосе, обработанном биоконсервантом с различным соотношением штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 (60-й день закладки, $n = 3$). Варианты: 1 – контроль, 2-5 – соотношение штаммов ВКПМ В-4173, ВКПМ В-2092 и ВКПМ В-5723 составляло 1:1:1, 2:2:1, 3:3:1 и 4:4:1, соответственно.

Таким образом, проведенные исследования по влиянию различных соотношений компонентов разрабатываемого биоконсерванта на параметры, определяющие качество силоса, показали, что наиболее высокое содержание белка было отмечено в вариантах 3 и 4, максимальное содержание молочной кислоты – в варианте 3, и минимальное содержание аммиака – снова в варианте 3. Таким образом, по совокупности полученных результатов наиболее оптимальным является соотношение входящих в состав биоконсерванта штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723, равное 2:2:1.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных лабораторных исследований была оптимизирована технология получения сухих бактериальных препаратов штаммов *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723. Были подобраны оптимальные режимы концентрирования культуральных жидкостей упомянутых бактерий и их предварительного замораживания перед лиофилизацией, позволяющие минимизировать потери биомассы и получать сухие бактериальные препараты с содержанием жизнеспособных клеток на уровне не менее $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл.

На основании проведенного анализа ряда биохимических параметров было подобрано оптимальное соотношение всех трех бактерий в конечном препарате биоконсерванта, обеспечивающее более высокие показатели качества силоса. На основании полученных результатов, авторы считают возможным рекомендовать к использованию разрабатываемый биоконсервант для улучшения качества силосных кормов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.579.21.0107 от 15.10.2015 г., RFMEF157915X0107).

ЛИТЕРАТУРА

- Балпанов Д.С., Тен О.А., Есепбай Г.Е., Барбасова С.К. Технология получения закваски для силосования грубостебельчатых кормов с использованием молочнокислых и пропионовокислых культур // Биотехнология. Теория и практика. – 2014. – № 1. – с. 79-84.
- ГОСТ 23638-90. Силос из зеленых растений. – М. – 1991. – 12 с.
- Карташов М.И., Воинова Т.М., Сергеева А.В., Стацок Н.В., Роговский С.В., Гребенева Я.О., Дурников Д.А. Новый высокопродуктивный штамм *Propionibacterium acidipropionici* с повышенной устойчивостью к пропионовой кислоте и масштабирование технологии его наработки в промышленных биореакторах // Вестник Днепропетровского университета. Биология, экология. – 2016. – Т. 24. – № 2. – С. 512–518.
- Левахин В.И., Поберухин М.М., Сиразетдинов Р.Ф., Бабичева И.А. Влияние силоса, заготовленного с биоконсервантами, на переваримость питательных веществ рационов и обмен энергии в организме животных // Известия Оренбургского ГАУ. – 2012. – Т. 33. – № 1-1. – С. 243-245.
- Практикум по зоотехническому анализу кормов: Учебное пособие (общ. ред. И.Ф. Драганова, В.М. Косолапова). – М.: Изд-во РГАУ–МСХА. – 2012. – 320 с.
- Addah W., Baah J., Okine E.K., McAllister T.A. A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of body weight gain of growing feedlot cattle // Journal of Animal Science. – 2012. – V. 90. – P. 1541–1552.
- Benfeldt C., Morgenstern H.U. Strains of *Propionibacterium* // US Patent Application 2015/0150298. – 2015.
- Bolsen K.K., Bonilla D.R., Huck G.L., Young M.A., Hart-Thakur R.A. Effect of a propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage // Journal of Animal Science. – 1996. – V. 74. – P. 274.
- Brul S., Coote P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms // International Journal of Food Microbiology – 1999. – V. 50. – P. 1–17.
- Davidson M.P. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds / In: Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington: ASM press. – 2001. – P. 593–627.
- Davies D.R. Silage inoculants – where next? // Proceedings of the 14th International Symposium of Forage Conservation, March 17-19, 2010, Brno, Czechia. – 2010. – P. 32-39.
- Donaghy J., Kelly P.F., McKay A.M. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 50. – P. 257-260.
- Flores-Galaraza R.O., Glatz B.A., Bern C.J., Van Fossen L.D. Preservation of high-moisture corn by microbial fermentation // Journal of Food Protection. – 1985. – V. 48. – P. 407-411.
- Garzia L., Giovanna S. A survey of lactic acid bacteria in italian silage // Journal of Applied Bacteriology. – 1984. – V. 56. – P. 3373–3379.
- Holzer M., Mayrhuber E., Danner H., Braun R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation // Trends in Biotechnology. – 2003. – V. 21. – No. 6. – P. 282-287.
- Huisden C.M., Adesogan A.T., Kim S.C., Ososanya T. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage // Journal of Dairy Science. – 2009. – V. 92. – P. 690–697.
- Jones L., Morse D. Using a high quality silage inoculant to increase the value of fermented feeds – a farms largest operational asset // Earth Bioresources and Life Quality. – 2013. – No. 4. – P. 1-5.
- Loureiro V., Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages // Trends in Food Science Technology. – 1999. – V. 10. – P. 356–365.
- Moraïs S., Shterzer N., Grinberg I.R., Mathiesen G., Eijssink V.G.H., Axelsson L., Lamed R., Bayer E.A., Mizrahi I. Establishment of a simple *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79. – No. 17. – P. 5242–5249.
- Multon J.L. Quality control for foods and agricultural products. New York: Wiley-VCH. – 1996.
- Ni K., Wang Y., Pang H., Cai Y. Effect of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and chemical composition of wheat straw silage // American Journal of Plant Science. – 2014. – V. 5. – P. 1877-1884.
- Ozkose E., Akyol I., Kar B., Comlekcioglu U., Ekinci M.S. Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants // Folia Microbiology. – 2009. – V. 54. – No. 4. – P. 335–342.
- Parker J.A., Moon N.J. Interactions of *Lactobacillus* and Propionic bacterium in mixed culture // Journal of Food Protection. – 1982. – V. 45. – P. 326–330.
- Ranjit N.K., Kung L., Jr. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage // Journal of Dairy Science. – 2000. – V. 83. – P. 526–535.
- Romero J.J., Zarate M.A., Arriola K.G., Gonzalez C.F., Silva-Sanchez C., Staples C.R., Adesogan A.T. Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage // Journal of Dairy Science. – 2015. – V. 98. – P. 1-13.

Rossi F., Rudella A., Marzotto M., Dellaglio F. Vector-free cloning of a bacterial endo-1,4- β -glucanase in *Lactobacillus plantarum* and its effect on the acidifying activity in silage: use of recombinant cellulolytic *Lactobacillus plantarum* as silage inoculant // Antonie van Leeuwenhoek. – 2001. – V. 80. – P. 139–147.

Queiroz O.C.M., Adesogan A.T., Arriola K.G., Queiroz M.F.S. Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos // Journal of Dairy Science. – 2012. – V. 95. – P. 3354–3362.

Sergeeva A., Statsyuk N., Kartashov M., Voinova T., Rogovsky S., Gula E., Mironov V. A new bacitracin-resistant nisin-producing strain of *Lactococcus lactis* and its physiological characterization // Jundishapur Journal of Microbiology, under review.

Weinberg Z.G., Ashbell G., Hen Y., Azrieli A. The effect of applying lactic acid bacteria on the aerobic stability of silages // Journal of Applied Bacteriology. – 1993. – V. 75. – P. 512–518.

Yitbarek M.B., Tamir B. Silage Additives: Review // Open Journal of Applied Sciences. – 2014. – V. 4. – No. 5. – Article ID 44897.

REFERENCES

- Addah, W., Baah, J., Okine, E.K., McAllister, T.A. (2012) A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of body weight gain of growing feedlot cattle, *Journal of Animal Science*, 90, 1541–1552.
- Balpanov, D.S., Ten, O.A., Esepbai, G.E., Barbasova, S.K. (2014) Tehnologiya polucheniya zakvaski dlya silosovaniya grubostebel'chatykh kormov s ispol'zovaniem molochnokislykh i propionovokislykh kul'tur. *Biotehnologiya: teoriya i praktika*, 1, 79–84 (in Russian).
- Benfeldt, C., Morgenstern, H.U. (2015) Strains of *Propionibacterium*. US Patent Application 2015/0150298.
- Bolsen, K.K., Bonilla, D.R., Huck, G.L., Young, M.A., Hart-Thakur, R.A. (1996) Effect of a propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage. *Journal of Animal Science*, 74, 274.
- Brul, S., Coote, P. (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.
- Davidson, M.P. (2001) *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. In: Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington: ASM press.
- Davies, D.R. (2010) *Silage inoculants – where next?* Proceedings of the 14th International Symposium of Forage Conservation, March 17–19, 2010, Brno, Czechia.
- Donaghy, J., Kelly, P.F., McKay, A.M. (1998) Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 257–260.
- Flores-Galaraza, R.O., Glatz, B.A., Bern, C.J., Van Fossen, L.D. (1985) Preservation of high-moisture corn by microbial fermentation. *Journal of Food Protection*, 48, 407–411.
- Garzia, L., Giovanna, S. (1984) A survey of lactic acid bacteria in italian silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 56, 3373–3379.
- GOST 23638-90. *Silos iz zelyenykh rastenii*. (1991). Moscow: StandartInform (in Russian).
- Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H., Braun, R. (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 282–287.
- Huisden, C.M., Adesogan, A.T., Kim, S.C., Ososanya, T. (2009) Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 92, 690–697.
- Jones, L., Morse, D. (2013) Using a high quality silage inoculant to increase the value of fermented feeds – a farms largest operational asset. *Earth Bioresources and Life Quality*, 4, 1–5.
- Kartashov, M.I., Voinova, T.M., Sergeeva, A.V., Statsyuk, N.V., Rogovsky, S.V., Grebeneva, Y.O., Durnikin, D.A. (2016) A new highly productive *Propionibacterium acidipropionici* FL-48 strain with increased resistance to propionic acid and the scaling up of its production for industrial bioreactors. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology*, 24(2), 512–518 (in Russian).
- Levakhin, V.I., Poberukhin, M.M., Sirazetdinov, R.F., Babicheva, I.A. (2012) Vliyanie silosa, zagotovlennogo s biokonservantami, na perevarimost' pitatelnykh veshchestv ratsionov i obmen energii v organizme zhivotnykh. *Izvestiya Orenburgskogo GAU*, 33(1-1), 243–245 (in Russian).
- Loureiro, V., Querol, A. (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science Technology*, 10, 356–365.

- Moraïs, S., Shterzer, N., Grinberg, I.R., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Lamed, R., Bayer, E.A., Mizrahi, I. (2013) Establishment of a simple *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5242–5249.
- Multon, J.L. (1996) *Quality control for foods and agricultural products*. New York: Wiley-VCH.
- Ni, K., Wang, Y., Pang, H., Cai, Y. (2014) Effect of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and chemical composition of wheat straw silage. *American Journal of Plant Science*, 5, 1877-1884.
- Ozkose, E., Akyol, I., Kar, B., Comleksioğlu, U., Ekinçi, M.S. (2009) Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia Microbiology*, 54 (4), 335–342.
- Parker, J.A., Moon, N.J. (1982) Interactions of *Lactobacillus* and Propionic bacterium in mixed culture. *Journal of Food Protection*, 45, 326–330.
- Praktikum po zootehnicheskomu analizu kormov: uchebnoe posobie*. (2012). I.F. Draganov & V.M. Kosolapov (Eds.). Moscow: RGAU (in Russian).
- Ranjit, N.K., Kung, L., Jr. (2000) The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 83, 526–535.
- Romero, J.J., Zarate, M.A., Arriola, K.G., Gonzalez, C.F., Silva-Sanchez, C., Staples, C.R., Adesogan, A.T. (2015) Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage. *Journal of Dairy Science*, 98, 1-13.
- Rossi, F., Rudella, A., Marzotto, M., Dellaglio, F. (2001) Vector-free cloning of a bacterial endo-1,4-β-glucanase in *Lactobacillus plantarum* and its effect on the acidifying activity in silage: use of recombinant cellulolytic *Lactobacillus plantarum* as silage inoculant. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 139–147.
- Queiroz, O.C.M., Adesogan, A.T., Arriola, K.G., Queiroz, M.F.S. (2012) Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos. *Journal of Dairy Science*, 95, 3354-3362.
- Sergeeva, A., Statsyuk, N., Kartashov, M., Voinova, T., Rogovsky, S., Gula, E., Mironov, V. A new bacitracin-resistant nisin-producing strain of *Lactococcus lactis* and its physiological characterization. *Jundishapur J. Microbiol.*, under review.
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A. (1993) The effect of applying lactic acid bacteria on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 512–518.
- Yitbarek, M.B., Tamir, B. (2014) Silage Additives: Review. *Open Journal of Applied Science*, 4(5), Article ID 44897.