

(11) **EE 201400005 A**

(51) Int.Cl.
A23K 3/02 (2014.01)
C12N 1/20 (2014.01)
C12R 1/24 (2014.01)

(12) **PATENDITAOTLUS**

<p>(21) Patenditaotluse number: P201400005</p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: 14.02.2014</p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: 15.09.2015</p> <p>(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed: NCIMB 42149, 29.05.2013, NCIMB</p>	<p>(71) Patenditaotleja: OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</p> <p>(72) Leiutise autorid: Kristiina Kokk Ringtee 31, Tõrvandi, Ülenurme vald, 61715 Tartu maakond, EE Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE Andres Olt Sangla 25-8, 50407 Tartu, EE Helgi Kaldmäe Kreutzwaldi 40-8, 51006 Tartu, EE Olav Kärt Löhe 28, 13516 Tallinn, EE Meelis Ots Tammsaare 5-13, 51006 Tartu, EE</p> <p>(74) Patendivolinik: Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</p>
--	--

(54) **Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 ja selle kasutamine**

(57) Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149, mida kasutatakse sööda aeroobse stabiilsuse tagamiseks ja fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks. Mikroorganismi kasutamine sileerimisel pärsib patogeensete mikroobide (klostriidide ja enteropatogeenide) ning pärm- ja hallitusseente toimet. Mikroorganismi sisaldav söödalisand pikendab sööda säilimisega.

(57) The invention provides the isolated microorganism *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149, which is used for securing the aerobic stability of feed and improving the fermentation of feed, for increasing the concentration of lactic acid and acetic acid, for reducing pH, hence decreasing the loss of nutrients in feed. *L. brevis* TAK 124-1 suppresses the function of pathogens (Clostridia and enteropathogens), yeast and fungi in feed. Feed additive comprising said microorganism helps to extend shelf-life of feed.

ISOLEERITUD MIKROORGANISMI TÜVI *LACTOBACILLUS BREVIS* TAK
124-1 NCIMB42149 JA SELLE KASUTAMINE

TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ning leiab kasutamist
5 sööda valmistamisel. Leiutis käsitleb mikrobioloogilist
silokindlustuslisandit ning selle kasutamist sööda aeroobse
stabiilsuse tagamiseks, fermenteerimise kvaliteedi ja seeläbi
sööda kvaliteedi tõstmiseks.

10 TEHNIKA TASE

Silo toitainete sisalduse säilitamine on vajalik alates sööda
koristamisest ja konserveerimisest kuni sööda tarbimiseni
looma poolt.

Silo on fermenteeritud sööt, mis on saadud kõrge
15 niiskusesisaldusega taimse materjali sileerimisel
kontrollitud fermentatsiooni tingimustes (McDonald, P.,
Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of
silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p.
340).

20 Sileerimine on taimse loomasööda säilitamise meetod, mis
põhineb piimhappelisel fermentatsioonil anaeroobsetes
tingimustes (Rooke, J., A. and Hatfield, G., D., 2003.
Biochemistry of Ensiling. In: Silage Science and Technology.
D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American
25 Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp. 95-139).
Silo fermentatsiooni võib jagada nelja faasi: 1) aeroobne
faas hoidlas peale koristamist, 2) fermentatsiooni faas, 3)
stabiilne hoiustamise faas ja 4) silo väljalaadimise faas,
kui hoidla on avatud ja silo puutub kokku õhuga. Kvaliteetse
30 silo valmistamisel on oluline sileeritava materjali õige
mikrobiaalne fermentatsioon. Edukas fermentatsioon sõltub ka
heintaimede tüübist, kvaliteedist, sileerimisprotsessis
kasutatavatest tehnoloogilistest võtetest, ilmastikust,

soovimatute mikroorganismide (nt klostriidide, enteropato-
geenide, listeeriate, batsillide) ja seente (pärm- ja
hallitusseened) arengust ning sileeritava materjali
kuivainesisaldusest.

- 5 Sööda looduslikku fermentatsiooni on keeruline kontrollida,
kuna silo fermentatsioon on mitmete erinevate keemiliste ja
mikrobioloogiliste protsesside ning nende koosmõjude
kompleks.

Suurem osa silost valmistatakse kuivainesisalduse juures 200-
10 500 g/kg. Sellise sisalduse juures on paljud taime ensüümid
sileerimisprotsessil aktiivsed ning neis tingimustes suudavad
silos kasvada hulgaliselt soovitud kui ka soovimatud
mikroorganismid, pärmid ja hallitused. Seega on kogu
bioloogilise aktiivsuse kontrolli alla saamine märkimisväärne
15 väljakutse ning seda on võimalik saavutada vaid hästi juhitud
sileerimisprotsessi kaudu (Muck, R. E. 2010. Silage
microbiology and its control through additives. R. Bras.
Zootec. Vol. 39. July).

Kontrollitud sileerimisprotsessis toimub veeslahustuvate
20 süsivesikute fermenteerimine piimhappeks piimhappebakterite
poolt. Selle tulemusena sileeritava materjali pH langeb
(sileeritav mass hapestub) ning see omakorda surub maha
riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevuse (Oude
Elferink, S. J. W. H., Driehuis, F., Gottschal, J. C.,
25 Spoelstra, S. F. 2000. Silage fermentation processes and
their manipulation. - Journal FAO Plant Production and
Protection No 161, pp 17-30). Mida kiiremini langeb silo
happesus pH 4 juurde, seda kiiremini ensümaatiline ja
mikrobiaalne aktiivsus lakkab, sööt muutub stabiilseks ja
30 rohkem toitaineid säilitatakse.

Juba varasemalt on dokumenteeritud, et silo fermentatsiooni kvaliteeti saab oluliselt parandada piimhappebaktereid sisaldavate lisanditega (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. 5 Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340).

Sama tähtis, kui toitainete säilitamine silo fermentatsiooni ja hoiustamise faasis, on oluline säilitada silo toitained hoidla avamisel. Silo võib olla eksponeeritud hapnikule nii söötmise eesmärgil silohoidla avamisel kui ka hoidla 10 katmisest tingitud vigade tagajärjel.

Kõik silod, puutudes kokku õhuga, riknevad varem või hiljem aeroobsete mikroorganismide aktiivse elutegevuse tulemusena. Lisaks mõjutavad silo aeroobset stabiilsust nii sileeritav silokultuur ja tema koristusaegne kasvufaas, fermentatsiooni 15 biokeemilised ja mikrobioloogilised faktorid, silomaterjali füüsikalised ja silomajanduse korralduslikud faktorid, temperatuur kui ka silokindlustuslisandi valik. Silo aeroobse stabiilsuse näitajaks loetakse aega, kui kaua suudab silo vastu panna aeroobsetele riknemisprotsessidele, st kui kaua 20 püsib silo õhu juurdepääsul kvaliteetsena. Silo aeroobset stabiilsust hinnatakse silo temperatuuri tõusmise kiiruse kaudu. Mida kauem püsib silo temperatuur stabiilne, st silo temperatuur ei ületa ümbritseva keskkonna (ambientset) temperatuuri üle 3°C (Komisjoni Määrus (EÜ) nr 429/2008; DLG- 25 Richtlinien für die Prüfung von Siliermitteln auf DLG-Gütezeichen-Fähigkeit Oktober 2013), seda aeroobselt stabiilsem ja parem on silo. Enamikes aeroobselt riknevates silodes tõuseb temperatuur üle ambientse temperatuuri hapete ja veeslahustuvate süsivesikute mikrobiaalsel oksüdatsioonil 30 süsihappegaasiks ja veeks.

Kuigi anaeroobsetes tingimustes silo madal pH surub maha soovimatute mikroorganismide kasvu, ei ole madal pH iseenesest piisav aeroobse rikkumise ärahoidmiseks. Silo rikkumine aeroobsetes tingimustes saab alguse enamasti pärmseentest, kes saavad kasvada ka üsna madala pH juures. Pärmid on suutelised kasvama laias pH vahemikus (pH 3-8). Optimaalne pH enamike pärmide kasvuks on 3,5-6,5. Kui silo puutub hoidla avamisel kokku õhuga, siis fermentatsioonil tekkinud happed jt ühendid oksüdeeritakse aeroobsete bakterite, pärmide ja hallituste poolt. Pärmide elutegevuse tulemusena tekib süsinikdioksiid ning see põhjustab silo kuumenemist, mis omakorda on otseselt kuivaine kadude põhjustaja (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340).

Pärmseened kasutavad energia allikana silos olevat jääksuhkrut, kuid esimeses järjekorras eelistavad piimhapet. Seetõttu on aeroobsele rikkumisele iseäranis vastuvõtlikud just hästi fermenteerunud silod, milles on palju piimhapet. Pärmseente tegevuse tulemusena hakkab silo pH tõusma ning tekib võimalus aktiveeruda mitmetel teistel aeroobsetel mikroorganismidel ja hallitusseentel. Hästi fermenteerunud toitaineterikka silos aktiivse mikrobialse tegevuse ilminguks on silo temperatuuri tõus.

On leitud (Ohyama, Y., Hara, S. and Masaki, S. (1980) Analysis of the factors affecting aerobic deterioration of grass silages. In Thomas, C. (ed.) Forage conservation in the 80s. BGS Occasional Symposium No. 11, pp. 257-261. Reading, UK: British Grassland Society.), et silo aeroobse stabiilsuse olulised mõjufaktorid on silo kuivaine-, äädik- ja propioonhappesisaldus ning pärm ja hallitusseente arv silohoidla avamisel. Negatiivne seos kuivainesisalduse ja pärmide osas näitas, et suurem kontsentratsioon põhjustas

õhuga kokku puutumisel silo temperatuuri kiirema tõusu. Seevastu äädik- ja võihappe näitasid, et nende fermentatsiooniproduktide suuremat kontsentratsiooni seostati stabiilsema siloga.

- 5 Nagu mainitud, silo madalal pH väärtusel aeroobset riknemist põhjustavatele mikroorganismidele otsest mõju ei ole, kuid erinev tähtsus on silo fermentatsioonil tekkinud hapetel. Pärmide kasvu inhibeerivad dissotseerumata lühikese ahelaga rasvhapped (Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H. and Spoelstra S.F. (2003) Microbiology of ensiling. In: Buxton D.R., Muck R.E. and Harrison J.H. (eds) Silage science and technology, pp. 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication No. 42, American Society of Agronomy).
- 10 Dissotseerumata happe molekulid on võimelised läbima mikroobi rakumembraani passiivse difusiooni teel, mille tulemusel vabanevad H^+ ioonid. See alandab rakusisest pH-d ja selle tagajärjel rakk hukkub. Millises ulatuses mingi hape silos dissotseerub, sõltub happe dissotsatsiooni konstandist (pKa) ja silo pH-st (Zirchrom (2011) Dissociation constants of
- 15 organic acids and bases. Available at: <http://www.zirchrom.com/organic.htm> (accessed 3 November 2011)). Äädik- ja propioonhape dissotseeruvad vähem kui piimhape, millega on seletatav hästi fermenteerunud piimhappelise silo vastuvõtlikus aeroobsele riknemisele.
- 25 Seevastu äädik- ja propioonhape on efektiivsed pärm- ja hallitusseente inhibeerijad. Võihappel on sarnane mõju. Võihappeline silo on aeroobselt stabiilne, kuid see viitab riknemist põhjustavate klostriidide aktiivsusele. Sellisel silol on suured toitainete kaod ja kõrge võihappesisaldus
- 30 võib loomadel põhjustada terviseprobleeme. Propioonhapet esineb silos harva ja väikestes kogustes ning seda produtseerivate mikroorganismide kontsentratsioon silokultuuridel on väike ja nende konkurentsivõime on madal.

Äädikhappesisaldus silos viitab heterofermentatiivsele käärimisele ning kuna äädikhape on pärmidele väga toksiline, siis sellised silod on tavaliselt aeroobselt väga stabiilsed.

Ideaalne silo fermentatsioon vähendab fermentatsiooni kadusid ning tagab piisava stabiilsuse sööda säilitamisel ja hoidlast väljalaadimisel söötmiseks. Efektiivne silokindlustuslisand, silo valmistamise ja söötmise õige korraldamine mängivad võtmerolli nimetatud eesmärkide täitmisel. Enamik silokindlustuslisandeid on välja töötatud sileerimise protsessi ja sileeritud sööda toiteväärtuse parandamiseks. Kuid silokindlustuslisanditest oodatakse, et nad peale silo kiire fermentatsiooni ja kvaliteedi parandamise suruksid maha ka riknemist (sh aeroobset riknemist) põhjustavate organismide kasvu. Peamised põhjused silokindlustuslisandi kasutamiseks silo aeroobse stabiilsuse parandamisel on ära hoida silo kuumenemine, toitainete kaod ning loomade jõudluse langus, mis võib olla põhjustatud riknenud silo söötmisest.

Silokindlustuslisandites kasutatakse sageli ensüüme, kuid need ei inhibeereri pärme ja hallitusi, mistõttu ensüümidega valmistatud silodel on väga tagasihoidlik aeroobne stabiilsus.

Silo aeroobse stabiilsuse parandamisel on efektiivsed orgaanilised happed, nagu propioon-, äädik- ja bensoehape jt. Neid lisatakse kas suures koguses, et saavutada sööda nn lõplik konserveerimine, või väiksemas koguses. Viimasel juhul küll surutakse maha pärmseente aktiivsus, kuid ei tagata täielikku konserveerimist ja sileerimine sõltub jätkuvalt looduslikust fermentatsioonist. Samuti on leitud ammoniaagi pärssiv mõju aeroobsetele bakteritele ning pärm- ja hallitusseentele. Paraku on orgaanilised happed jt kemikaalid

söövitava toimega ning kahjustavad silotehnikat ning nendega ümberkäimisel ja ladustamisel on ranged ohutusnõuded.

Piimhappebakteritel baseeruvaid bioloogilisi silokindlustus-
lisandeid käsitletakse kui looduslikke produkte ning nende
5 eeliseks on, et ei ole toksilised, ei korrodeeri seadmeid ja
ei põhjusta keskkonna riske.

Piimhappebakterite abil silo pH langetamise eesmärgiks on
minimeerida fermentatsioonikadusid. Piimhappebaktereid
jaotatakse glükoosi fermentatsiooni alusel kahte rühma:
10 homofermentatiivsed ning heterofermentatiivsed.
Homofermentatiivsed piimhappebakterid toodavad ühest moolist
glükoosist kaks mooli piimhapet, heterofermentatiivsed
bakterid aga toodavad ühe mooli piimhapet, ühe mooli
süsinikdioksiidi ja ühe mooli kas etanooli või äädikhapet.
15 Teada on, et käärimisprotsessi alguses domineerivad
homofermentatiivsed liigid, kuid hiljem keskkonna
happelisemaks muutumisel saavutavad ülekaalu
heterofermentatiivsed bakterid (Muck, R. E. 2010. Silage
microbiology and its control through additives. R. Bras.
20 Zootec. Vol. 39. July).

Homofermentatiivsetel piimhappebakteritel baseeruvad
silokindlustuslisandid parandavad silo fermentatsiooni kulgu,
kuid enamuse selliseid bakterijuuretisi inhibeerivad vähe
pärmide ja hallituste kasvu. Võib juhtuda, et sellise
25 silokindlustuslisandi kasutamisel on silo aeroobne stabiilsus
väiksem kui ilma kindlustuslisandita silol ning võib isegi
suurendada silo kuumenemise riski.

Mõned silojuuretised sisaldavad baktereid (nt
propioonhappebaktereid), mis toodavad propioonhapet. Paraku
30 silo aeroobne stabiilsus ei parane, kuna need mikroorganismid
pole üldiselt happetolerantsed ja on aeglase kasvuga. Küll

aga juuretised, mis produtseerivad lisaks piimhappele suures koguses ka äädikhapet (*L. brevis* või *L. buchneri*), pärsivad silo aeroobset riknemist põhjustavaid mikroorganisme (pärm- ja hallitusseeni jt), st parandavad silo aeroobset stabiilsust ja hoiavad ära silo riknemise hoidla avamisel vm kokkupuutel õhuga.

Heterofermentatiivsete piimhappebakterite lisamine sileerimisel alandab pH-d ning vähendab kuivainekadusid. Lisaks on mõnedel sellistel tüvedel täheldatud tugevat inhibeerivat toimet pärmide ja hallituste kasvule, tõstes seeläbi silo aeroobset stabiilsust (Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., Ohlsson, C., Lund, B. 2013. The effect of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silage. *Agricultural and Food Science*. 22:137-144).

Ka Danner et al (Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., Braun, R. 2003. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, no. 1, pp 562-567) on leidnud, et heterofermentatiivsesse gruppi kuuluv *Lactobacillus brevis* on paljulubav tüvi silo aeroobse stabiilsuse tõstmiseks.

Piimhappebakterite kasutamist silo kvaliteedi tõstmiseks ja aeroobse stabiilsuse tagamiseks on kirjeldatud mitmetes patenditaotlustes ning patentides. Sagedamini kasutatakse *Lactobacillus brevis* tüvesid kombinatsioonis teiste piimhappebakteritega.

Jaapani patenditaotluses JP2006042647 (Cho Takekuni et al, National Agriculture & Bio-Oriented Research Organization, 2006) kirjeldatakse silo fermenteerimist *Lactobacillus brevis* TM2 (FERM AP-20140) abil. Nimetatud bakter on madala pH ja

kõrge temperatuuri taluvusega ning omab antimikroobset toimet silo riknemist põhjustavate pärmiseente suhtes. *Lactobacillus brevis* TM2 kasutatakse koos äädikhapet tootva piimhappebakteriga TM1 (FERM AP-20139).

- 5 Jaapani patenditaotluses JPH02257875 (Yano Naotatsu Et Al., Kubota Ltd., 1990) kirjeldatakse silo fermenteerimist *Lactobacillus brevis* KB-292 (FERM P-1047) abil nii aeroobses kui anaeroobses keskkonnas, kusjuures nimetatud tüvi omab eriti head fermenteerimisvõimet silo fermentatsiooni
- 10 algusfaasis.

- Euroopa söödalisandite registrisse on kantud mitmed bakterit *Lactobacillus brevis* sisaldavad silokindlustuslisandid (tehnoloogilised lisandid), nt lisandid, mis sisaldavad *Lactobacillus brevis* DSM 21982, *Lactobacillus brevis* DSM
- 15 12835, *Lactobacillus brevis* IFA 92 (DSM 23231) (http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf, alla laetud 29.01.2014).

- Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) teadusliku arvamuse kohaselt
- 20 suurendab tüvi *Lactobacillus brevis* DSMZ 16680 silo aeroobset stabiilsust (EFSA Journal 2014; 12(1):3534), niisamuti nagu tüvi *Lactobacillus brevis* DSMZ 21982 (EFSA Journal 2012; 10(3):2617).

- Käesoleva leiutise eesmärgiks on pakkuda uus *Lactobacillus*
- 25 *brevis* tüvi sööda fermenteerimise kvaliteedi tõstmiseks, silo aeroobse stabiilsuse ja säilimisaja pikendamiseks.

LEIUTISE OLEMUS

- Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149, seda sisaldavat sööta, söödalisandit ja kompositsiooni. Söödaks võib olla
- 5 fermenteeritud sööt, nt silo. Söödalisandiks on näiteks silokindlustuslisand (*silage additive*). Kompositsiooni teisteks koostisosadeks võivad olla vajalikud abiained. Nimetatud mikroorganismi saab kasutada lüofiliseeritud kujul. Mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 abil
- 10 tagatakse sööda aeroobne stabiilsus.
- Nimetatud mikroobi kasutatakse sööda fermenteerimiseks ja fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks.
- 15 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 soodustab sööda piimhappelist fermentatsiooni, mille tulemusena toodetud piimhappe kiirendab silo pH vähendamist.
- Tuginedes antimikroobsete omaduste uuringutele, surub *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 söödas alla
- 20 mittesoovitud mikroorganismide (patogeensete mikroorganismide ning pärm- ja hallitusseente) toimet. Nimetatud enteropatogeenideks on *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*
- 25 *sakazakii*, *Staphylococcus aureus* jt. Nimetatud klostriidideks on *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* jt.
- Leiutise objektiks on ka meetod sööda säilimisaja pikendamiseks, kus fermenteerimisel lisatakse söödale mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.
- 30 Nimetatud tüve kasutatakse arvestusega 1×10^5 - 1×10^6 pmü/g fermenteeritava sööda kohta.

TÜVE KIRJELDUS

Mikroob *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 tüvi on isoleeritud ilma silokindlustuslisandeid kasutamata naturaalselt sileeritud liblikõieliste rohkest (rohkem kui 75
5 protsenti) silost Eestis. Hoidlast silopuuri abil võetud siloproovi kvantitatiivse laktobatsillaarse koostise väljaselgitamiseks tehti materjalist lahjenduste rea meetodil alaneva tiheduse astmetega suspensioon füsioloogilises lahuses (0,9 protsenti NaCl) ning teostati väljakülvid Rogosa
10 agarile (OXOID, U.K.), mida inkubeeriti temperatuuril 37°C anaeroobses keskkonnas (termostaat IG 150, Jouan, Prantsusmaa) 48 tundi. Väljakasvanud mikroobipesad kirjeldati, loendati ja määrati mikroobide üldhulk. Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti Grami järgi
15 värvitud preparaadid ja mikroskopeeriti. Leiutise objektiks olev tüvi isoleeriti *Lactobacillus spp* iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifitseerimine, mida järgnevalt kirjeldatakse.

20 Kultuur-morfoloogilised tunnused

Tunnused on määratud MRS agar ja puljongisöötmes (OXOID, UK) kasvatamise järgselt. *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 on korrapärase kujuga eosteta keskmise jämeduse ja pikkusega Gram-positiivne pulkbakter. Tema üksikrakud
25 asetsevad harilikult üksikult.

Füsioloogilis-biokeemilised tunnused

Mikroobitüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kultiveerimiseks on sobivaim MRS puljong, milles peale 24-48
30 tundi 37°C juures mikroaeroobset inkubeerimist ilmneb ühtlaselt hägune kasv. Mikroaeroobses keskkonnas

(CO2/O2/N2:10/5/85) on mikroobipesad 1,5-2,5 mm läbimõõduga, hallikas-valged, kumerad, korrapäratu äärega ja kõrgenenud keskosaga.

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 tüvi on
5 obliqaatselt heterofermentatiivne, katalaas- ja
oksüdaasnegatiivne, ei hüdrolüüsi arginiini, kuid
produtseerib glükoosi fermentatsioonil süsinikdioksiidi.
Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 37°C, kuid paljuneb ka
15°C juures. Vähesel määral on kasvu märgata ka 45°C juures.
10 Tüve kasvatamiseks optimaalseim pH on 5,5.

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 identifitseeriti
biokeemilise aktiivsuse alusel API 50CHL System (bioMérieux,
Prantsusmaa) test-kiti abil kui *Lactobacillus brevis*
(Kattuvus tüüptüvega: excellent, ID protsenti-79,0, T index
15 0,83). Samastamine sekveneerimisel: *Lactobacillus brevis* (16S
rRNA sarnasus tüüptüvega: 99 protsenti). Sisaldab kolme
plasmiidi suurusega 10 kb, 7 kb ja 6 kb.

Tüvi samastati kui *Lactobacillus brevis* kasutades MALDI
Biotyper-it (Bruker Daltonik): score value 2.136 (secure
20 genus identification).

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 tüvi deponeeriti
mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise
rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt
Ühendkuningriigis kultuurikollektsioonis National Collection
25 of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB) numbri
NCIMB42149 all 29. mail 2013.

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 süsivesikute
fermentatsiooniprofiil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi
fermenteerib: L-arabinoosi, riboosi, D-ksüloos, D-glükoosi,

D-fruktoosi, maltoosi, gentibioosi, naatrium 5-ketoglükonaati.

Resistentsus antibiootikumidele

- 5 Metoodika: *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 antibakteriaalsed tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna). Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele.
- 10 Tabel 1. *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 antibakteriaalne tundlikkus

Antibiootikum	<i>Lactobacillus brevis</i> TAK 124-1 murdepunkt (cut-off value) (mg/L)	Referentsväärtused*
Ampitsilliin	2	2
Gentamütsiin	1	16
Streptomütsiin	12	64
Erütromütsiin	0,25	1
Klindamütsiin	0,75	1
Tetratsükliin	4	8
Kloramfenikool	3	4
Kanamütsiin	12	32

*Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance EFSA Journal 2012;10(6):2740

- 15 Mikroobitüvi loetakse tundlikuks, kui selle kasv inhibeerub võrdsel või madalamal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist (cut-off value) ($S \leq x$ mg/L).

- 20 Mikroobitüvi loetakse resistentseks, kui selle kasv inhibeerub kõrgemal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist ($R > x$ mg/L).

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 tüvel ei esinenud resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes (Tabel 1).

TÜVE FUNKTSIONAALSED OMADUSED

Lühikese ahelaga rasvhapete profiil

- 5 Metoodika: 24 tunni vanune MRS agaril kasvatatud *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 suspendeeriti füsioloogilises lahuses McFarlandi standardid järgi 10^9 mikroobi/ml, 0,5 ml külvati PYG söötmesse (á 4,65 ml) ning inkubeeriti mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) termostaadis
- 10 37°C juures 24 ja 48 tundi.

- Lühikese ahelaga rasvhapete profiil määrati gaaskromatograafia HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkoloni HP-INNOWax (15 m x 0,25 mm; 0,15 µm). Koloni temperatuuri programm 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10 min,
- 15 detektor (FID) 250°C (Tabel 2).

Tabel 2. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe kontsentratsioon (g/l) PYG söötmes *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24 ja 48 tunni jooksul.

	Lühikese ahelaga rasvhapped (g/l)					
	äädikhape		piimhape		merivaikhape	
	24 t	48 t	24 t	48 t	24 t	48 t
<i>Lactobacillus brevis</i> TAK 124-1	0.130	0.174	0.983	1.261	0.056	0.056

- 20 Antimikroobne aktiivsus taimset päritolu laktobatsillidele ja patogeenidele.

Laktobatsilli antimikroobsete omaduste hindamiseks patogeenide vastu kasutati joonkülvitehnikat (Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

Sihtmikroobide inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasvuvaba tsoon millimeetrites. Analoogselt Hütt jt. (2006) järgi arvutati kasutatud valimi tulemuste põhjal aritmeetiline keskmine ning standardviga (Tabel 3) ja sellest lähtuvalt hinnati tüvede antagonistlikku aktiivsust (mm).

Tabel 3. *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 antimikroobne aktiivsus taimset päritolu laktobatsillidele ja patogeenidele modifitseeritud MRS agarsöötmeel joonkülvimeetodil (sihtmikroobi kasvupidurdus mm) mikroaeroobses (10 protsenti CO₂) ja anaeroobses (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) keskkonnas

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)	
	mikroaeroobne	anaeroobne
<i>Lactobacillus</i> spp	11,6± 4,2	16,2± 2,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	31,1± 3,3	12,0±1,8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	35,2± 0,8	22,8±2,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	32,8± 0,9	16,0±1,8
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	31,2± 1,4	16,7±3,0
<i>Shigella sonnei</i>	17,3± 1,9	17,2±2,5
<i>Escherichia coli</i>	33,9± 1,2	17,2±1,7
<i>Enterobacter sakazakii</i>	34,2± 1,0	17,2±2,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	30,2±2,8	18,4±1,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	28,0±1,7	16,0±2,5

Inhibitsioonitsoon mikroaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <26,9; keskmine 27,0-33,9; tugev>34.

Inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <14,9; keskmine 15,0-18,9; tugev>19.

5

Võrreldes patenteeritava tüve antimikroobseid omadusi üheksa silost pisteliselt valitud ja isoleeritud heterofermentatiivse piimhappebakteri tüvega (tabel 4), on näha, et *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 omab
10 anaeroobses keskkonnas (valdav keskkond silos) paremaid antimikroobseid omadusi.

Tabel 4. *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 ja taimset päritolu heterofermentatiivsete laktobatsillide antimikroobne
15 aktiivsus patogeenidele modifitseeritud MRS agarsöetmel joonkülvi meetodil (sihtmikroobi kasvupidurdus mm) mikroaeroobses (10 protsenti CO₂) ja anaeroobses (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) keskkonnas.

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm) <i>L. brevis</i> TAK 124-1		Kasvupidurdustsoon (mm) <i>Lactobacillus</i> spp	
	mikro-aeroobne	anaeroobne	mikro-aeroobne	anaeroobne
<i>Salmonella enteritidis</i>	24,3± 0,5	22,3± 0,5	29,3±6,5	11,4±9,1
<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	24,3± 0,5	22,5± 1,3	27,3±7,8	11,4±9,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13,8± 0,5	15,0± 0,0	11,0±1,6	6,0±6,5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 3932	28,3± 1,0	24,3± 1,0	28,3±3,8	12,8±10,4

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51774	28,8± 1,3	22,8± 0,5	28,3±4,9	11,4±10,9
<i>Enterobacter sakazakii</i>	24,8± 0,5	22,3± 0,5	29,8±7,0	12,1±8,5
<i>Escherichia coli</i>	25,5± 0,6	24,3± 0,5	30,7±6,7	13,3±9,1

Inhibitsioonitsoon mikroaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <22,9; keskmine 23,0-32,9; tugev>33.

Inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <11,9 keskmine 12-21,9; tugev>22.

5

Antimikroobset aktiivsust klostriidide vastu määrati järgmiselt.

Eraldati 24 tundi Brain Heart Infusion (BHI) puljongis inkubeeritud *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149

10 supernatant. Filtreerimise teel steriliseeritud supernatanti või steriilsesse BHI puljongisse (positiivne kontroll) lisati klostriidide suspensioon. Tulemusi hinnati 48 tunni pärast OD_{620nm} juures. Klostriidide CD kasvuinhibitsioon (protsenti) arvutati järgnevalt = 100-(OD_t X 100 / OD_c), millest

15 OD_t - supernatant lisatud

OD_c - supernatanti pole lisatud.

20 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 poolt produtseeritud antimikroobsed ühendid inhibeerivad taimset päritolu klostriidide kasvu 23,1 protsendi võrra.

Selle kasutamine tõhustab mistahes haljassöödast valmistatava silo tootmist, suurendades äädikhappe ja piimhappe moodustumist, mille tulemusena paraneb silo aeroobne
25 stabiilsus ja säilivus.

Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149 ei oma kahjulikku mõju looma tervisele, inimeste tervisele ega keskkonnale, kuna liik *L. brevis* on kantud EFSA poolt QPS (Qualified Presumption of Safety) staatusega taksonoomiliste ühikute nimekirja (EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J *2007; 587, 1-16).

JOONISTE LOETELU

10

Joonis fig 1 - 1. teostusnäide.

Raiheina silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - 2,3-butaandiool, g/kg kuivaines; g - pH; h - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

20 Joonis fig 2 - 2. teostusnäide.

Timuti silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - 2,3-butaandiool, g/kg kuivaines; g - pH; h - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

Joonis fig 3 - 3. teostusnäide.

30 Punase ristiku silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - 2,3-butaandiool, g/kg

kuivaines; g - pH; h - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

Joonis fig 4 - 4. teostusnäide.

- 5 Raiheina silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - 2,3-butaandiool, g/kg
- 10 kuivaines; g - pH; h - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

Joonis fig 5 - Raiheina silo (1. teostusnäide) aeroobse stabiilsuse parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1

15 NCIMB42149, kus alajoonis

- A - ambientne temperatuur ja kontrollsilo temperatuur (5 kordust),
- B - ambientne temperatuur ja *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur (5 kordust),
- 20 C - ambientne temperatuur ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo temperatuur (5 kordust);

Joonis fig 6 - Timuti silo (2. teostusnäide) aeroobse stabiilsuse parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1

25 NCIMB42149, kus alajoonis

- A - ambientne temperatuur ja kontrollsilo temperatuur (5 kordust),
- B - ambientne temperatuur ja *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur (5 kordust),
- 30 C - ambientne temperatuur ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo temperatuur (5 kordust);

Joonis fig 7 - Punase ristiku silo (3. teostusnäide) aeroobse stabiilsuse parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus alajoonis

5 A - ambientne temperatuur ja kontrollsilo temperatuur (5 kordust),

B - ambientne temperatuur ja *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur (5 kordust),

C - ambientne temperatuur ja keemilise silokindlustus- lisandiga valmistatud silo temperatuur (5 kordust);

10

Joonis fig 8 - Raiheina silo (4. teostusnäide) aeroobse stabiilsuse parandamine *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149, kus alajoonis

15 A - ambientne temperatuur ja kontrollsilo temperatuur (5 kordust),

B - ambientne temperatuur ja *Lactobacillus brevis* tüvega TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur (5 kordust),

C - ambientne temperatuur ja keemilise silokindlustus- lisandiga valmistatud silo temperatuur (5 kordust).

20

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

Järgnevatel teostusnäidetes kirjeldatakse erinevatest taimsetest materjalidest valmistatud silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamist, silo aeroobse stabiilsuse tagamist ja patogeensete mikroorganismide ning pärm- ja hallitusseente toime allasurumist ning silo säilimisaja pikendamist mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kasutamise abil.

30 Raiheina silo fermenteerimist käsitlevad kaks teostusnäidet (1. ja 4. näide), milles veeslahustuvate süsivesikute sisaldus raiheinas oli erinev (vastavalt 1,52 ja 2,85

protsenti). 2. näide käsitleb timuti ja 3. näide punase ristiku fermenteerimist.

Näide 1. Raiheina silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine ja silo aeroobse stabiilsuse tagamine mikroorganismiga
5 Lactobacillus brevis TAK 124-1 NCIMB42149.

Katse viidi läbi hübriidraiheinaga, mille veeslahustuvate süsivesikute sisaldus sileeritavas materjalis oli 1,52 protsenti. Haljasmass niideti ja seejärel närvutati 24 tundi. Närvutatud haljasmass koristati, hekseldati ning sellest
10 valmistati katsesilod. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita. Teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149. Kolmas silo valmistati sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli
15 järgmine: sipelghapet 42,5 protsenti, ammooniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti. Keemilist silokindlustuslisandit kasutati nn positiivse kontrollina ja seda lisati sileeritavale materjalile suhtega
20 3 l/t. Lüofiliseeritud piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisati sileeritavale materjalile vesilahusena kontsentratsioonis 1×10^5 pmü/g sileeritava taimse materjali (sööda) kohta. Kõik katsevariandid (kontrollsilod, piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis*
25 TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silod ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silod) valmistati viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Silo aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi Honig'i poolt kirjeldatud meetodil (Honig, H., 1990: Evaluation of the
30 aerobic stability. In: Proceedings of the Eurobac Conference, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala/Sweden, Special Issue). Silo loeti aeroobselt ebastabiilseks kui

selle geomeetrilisest keskpunktist mõõdetud temperatuur ületas 3°C võrra ambientset temperatuuri. Temperatuuri muutuseid ajas mõõdeti 9 päeva (216 tunni) vältel. Ruumi (ambientne temperatuur) ja katsesilode temperatuurid fikseeriti iga tunni aja tagant seadmetega Comet Temperature Data Logger S0141.

Siloproove analüüsiti üldtunnustatud meetodikate järgi (AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA).

Kuivainesisalduse määramisel kuivatati siloproov termostaadis 130°C juures konstantse kaaluni. Toortuhasisalduse leidmiseks põletati siloproovi kuus tundi muhvelahjus temperatuuril 550°C. Proteiinisaldus määrati analüsaatoriga Kjeltec™ 2300 Kjeldhali meetodil (Nx6,25). Toorkiud määrati W. Hennebergi ja F. Stohmanni meetodika järgi. Silos sisalduvate hapete ja etanooli sisalduse määramiseks kasutati gaaskromatograafi Agilent 7890A. Ammoniaaklämmastiku sisaldus üldlämmastikust määrati analüsaatoriga Kjeltec™ 2300. Silo happesus määrati pH-meetriga Hanna Instruments HI 2210.

Heterofermentatiivne piimhappebakter *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 parandas silo fermentatsiooni (tabel 5 ja joonis Fig 1). *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisamine suurendas silos piimhappesisaldust üle 2 korra ($p < 0,01$) ning äädkihappesisaldust üle 2,4 korra ($p < 0,01$) võrreldes kontrollsiloga. Samuti parandas *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 statistiliselt oluliselt ($p < 0,01$) fermentatsiooninäitajatest silo pH-d, ammoniaaklämmastiku sisaldust üldlämmastikust, 2,3-butaandioolisisaldust ning vähendas kuivaine kadusid fermentatsioonil. Silo riknemist põhjustavatest mikroorganismidest surus *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 maha pärmseente ($p < 0,05$) ja klostriidide ($p < 0,01$) populatsiooni võrreldes kontrollsiloga (tabel 6).

Tabel 5. Raiheina silo keemilise koostise, toiteväärtuse ja fermentatsiooni kvaliteedi näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 (näide 1)

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustus-lisand	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	275,0	16,3	277,6	6,9	300,2	3,4
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	108,1	2,0	111,3	3,4	115,3	2,8
Toortuhk	107,0	1,2	102,1	5,1	100,5	2,6
Toorkiud	350,1	11,5	354,6	13,5	336,5	11,3
Lämmastikuta ekstraktiivained	407,8	11,0	405,0	15,5	420,7	12,8
Metaboli-seeruv energia, MJ/kg	8,5	0,0	8,6	0,0	8,6	0,1
Metaboli-seeruv proteiin	66,9	0,2	67,6	0,4	68,3	0,4
Etanool	13,9	2,3	22,2	2,8	5,9	3,1
Äädikhape	11,6	1,9	28,3	7,7	8,5	0,7
Propioonhape	0,2	0,0	0,1	0,0	0,6	0,1
Võihape	1,0	0,4	0,9	0,3	0,1	0,0
Piimhape	28,4	9,4	60,2	13,3	41,0	10,5
2,3-butandiool	37,6	8,9	5,5	1,0	4,3	1,0
pH	5,5	0,1	4,8	0,1	4,5	0,1
NH ₃ -N/üld N, %	10,5	0,6	8,5	0,5	6,7	0,7
Kuivaine kaod, %	7,1	0,3	5,9	0,4	3,1	0,4
Aerobne stabiilsus, h	32,2	7,4	99,2	9,0	58,8	24,3

Tabel 6. Raiheina silo fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 (näide 1)

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustuslisand	
	Keskmine, log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD
Pärmide arv	4,1	1,1	2,5	0,8	4,1	1,5
Hallituste arv	2,7	0,7	4,2	0,5	2,9	0,5
Klostriidide arv	3,5	0,7	<2,0*	NA**	2,3	0,3

* alla määramispiiri 10²

5 **- pole arvutatav

Silo aeroobse stabiilsuse katses läks ilma silokindlustuslisandita silo kuumaks 32. tunnil (tabel 5 ja joonis Fig 5), samas kui piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo püsis aeroobselt stabiilne 99 tundi ($p < 0,01$). Saadud tulemus ületas ka keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo vastavat näitajat (59 tundi) statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$).

15 Käesoleva teostusnäite kohaselt parandas piimhappebakter *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 silo fermentatsiooni võrreldes kontrollsiloga. Produtseerides rohkem piim- ja äädikhapet ning surudes maha silo riknemist põhjustavate mikroorganismide (pärmseente ja klostriidide) arengut, tagab *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149
20 kvaliteetse ja stabiilse silo nii hoidlas säilitamisel kui hoidla avamisel söötmiseks, hoides ära silo kuumenemise.

Seega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kasutamine suurendas silo piim- ja äädikhape kontsentratsiooni, alandas silo pH-d, vähendas sööda toitainete (kuivaine) kadusid, surus alla patogeensete mikroorganismide ja pärmseente toime, tagas silo parema aeroobse stabiilsuse ja pikendas silo säilimisaega.

Näide 2. Timuti silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine ja silo aeroobse stabiilsuse tagamine mikroorganismiga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.

Katse viidi läbi timutiga (*Phleum pratense* L.), mille veeslahustuvate süsivesikute sisaldus sileeritavas materjalis oli 1,10 protsenti. Haljasmass niideti ja seejärel närvutati 24h. Närvutatud haljasmass koristati, hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita. Teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149. Kolmas silo valmistati sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli järgmine: sipelghapet 42,5 protsenti, ammooniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti. Keemilist silokindlustuslisandit kasutati nn positiivse kontrollina ja seda lisati sileeritavale materjalile suhtega 3 l/t. Lüofiliseeritud piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisati sileeritavale materjalile vesilahusena kontsentratsioonis 1×10^5 pmü/g sileeritava taimse materjali (sööda) kohta. Kõik katsevariandid (kontrollsilod, piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silod ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silod) valmistati viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Katsesilode aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi ja siloproove analüüsiti näites 1 kirjeldatud meetodikate järgi.

Heterofermentatiivne piimhappebakter *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 produtseeris silosse rohkem äädikhapet (tabel 7 ja joonis Fig 2) võrreldes loodusliku piimhappebakterite populatsiooni toel fermenteerunud kontrollsilo ($p < 0,05$) ning keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo ($p < 0,01$) vastava näitajaga. Katsesilo mikrobioloogilised näitajad on esitatud tabelis 8.

10 Suurem äädikhappesisaldus silos parandas sööda aeroobset stabiilsust peale hoidla avamist, surudes maha aeroobsete mikroorganismide aktiivsuse ja seeläbi hoides ära silo kuumenemise.

15 Tabel 7. Timuti silo keemilise koostise, toiteväärtuse ja fermentatsiooni kvaliteedi näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustuslisandid	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	323,5	25,5	298,9	8,7	250,3	9,2
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	129,6	1,6	125,9	1,8	102,9	3,3
Toortuhk	85,2	2,1	82,5	2,0	83,4	1,1
Toorkiud	335,5	13,4	336,0	11,5	364,6	7,9
Lämmastikuta ekstraktiivained	422,7	12,3	428,6	13,7	422,1	8,6
Metaboli-seeruv energia, MJ/kg	9,2	0,1	9,2	0,0	9,1	0,0

Metaboli- seeruv proteiin	73,8	0,3	73,3	0,2	70,4	0,3
Etanool	3,9	0,9	4,4	1,6	1,8	0,8
Äädikhape	18,7	3,4	24,0	2,6	11,1	1,6
Propioon- hape	0,2	0,1	0,2	0,1	1,1	0,1
Võihape	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
Piimhape	63,0	5,7	63,5	4,9	65,8	8,9
2,3- butaandiool	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
pH	4,5	0,1	4,5	0,1	4,2	0,1
NH ₃ -N/üld N, %	5,5	0,3	5,6	0,3	7,3	0,6
Kuivaine kaod, %	2,5	0,1	3,0	0,2	2,0	0,1
Aeroobne stabiilsus, h	163,8	70,6	216	0,0	126,0	57,9

Tabel 8. Timuti silo fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustus- lisand	
	Keskmine, log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD
Pärmide arv	2,2	0,4	<2,0*	NA**	2,4	0,8
Hallituste arv	<2,0*	NA**	<2,0*	NA**	2,3	0,5
Klostriidide arv	2,1	0,1	<2,0*	NA**	2,0	0,1

* alla määramispiiri 10²

** - pole arvutatav

Piimhappebakteriga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur jäi aeroobse stabiilsuse katses

(tabel 7 ja joonis Fig 6) stabiilseks kogu katseperioodi vältel (>216 tundi). Kontrollsilod ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silod kuumenesid vastavalt 164. tunnil ($p < 0,01$) ja 126. tunnil ($p < 0,01$).

- 5 Teostusnäites 2 piimhappebakteri *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kasutamine suurendas silo äädikhappe kontsentratsiooni ja tagas silo aeroobse stabiilsuse, pikendades silo säilimisaega.
- 10 Näide 3. Punase ristiku silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamine ja silo aeroobse stabiilsuse tagamine mikroorganismiga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.
- Katse viidi läbi tetraploidse punase ristikuga (*Trifolium pratense* L.), mille veeslahustuvate süsivesikute sisaldus
- 15 sileeritavas materjalis oli 0,62 protsenti. Haljasmass niideti, seejärel hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita. Teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1
- 20 NCIMB42149. Kolmas silo valmistati sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli järgmine: sipelghapet 42,5 protsenti, ammooniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti.
- 25 Keemilist silokindlustuslisandit kasutati nn positiivse kontrollina ja seda lisati sileeritavale materjalile suhtega 3 l/t. Lüofiliseeritud piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisati sileeritavale materjalile vesilahusena kontsentratsioonis 1×10^5 pmü/g sileeritava
- 30 taimse materjali (sööda) kohta. Kõik katsevariandid (kontrollsilod, piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silod ja keemilise

silokindlustuslisandiga valmistatud silod) valmistati viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Katsesilode aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi ja siloproove analüüsiti näites 1 kirjeldatud meetodikate järgi.

- 5 Piimhappebakteri tüvi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 parandas punase ristiku silo fermentatsiooni näitajaid (tabel 9 ja joonis Fig 3). *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisamine suurendas piimhappesisaldust üle 2 korra ($p < 0,01$) ning langetas seeläbi silo pH-d ($p < 0,01$)
- 10 võrreldes kontrollsiloga. Sellega vähendati silos mittesoovitud propioonhappe- ($p < 0,01$), 2,3-butaandiooli- ($p < 0,01$) ja ammoniaaklämmastiku sisaldust üldlämmastikust ($p < 0,01$) ning kuivaine kadusid ($p < 0,01$). Mikrobioloogilised näitajad on esitatud tabelis 10.

15

Tabel 9. Punase ristiku silo keemilise koostise, toiteväärtuse ja fermentatsiooni kvaliteedi näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustuslisand	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	174,9	1,1	176,6	0,8	182,7	4,1
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	225,3	2,2	228,9	5,4	234,1	3,6
Toortuhk	119,5	1,1	117,4	2,0	111,9	1,7
Toorkiud	240,5	8,8	226,1	7,3	204,4	6,5
Lämmastikuta ekstraktiivained	379,5	8,8	388,8	6,7	410,2	6,8
Metaboliseeruv energia, MJ/kg	9,4	0,1	9,4	0,0	9,4	0,1
Metaboliseeruv proteiin	84,2	0,3	84,7	0,7	86,0	0,7

Etanool	11,6	3,2	8,4	2,6	4,9	2,2
Äädikhape	21,3	6,4	22,9	6,1	24,1	9,1
Propioonhape	1,8	0,2	0,6	0,2	1,2	0,3
Võihape	2,0	1,0	1,9	0,2	0,8	0,3
Piimhape	21,5	5,4	44,4	5,8	73,3	12,0
2,3-butaan- diool	0,3	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
pH	5,9	0,0	5,5	0,1	4,8	0,2
NH ₃ -N/üld N, %	11,6	0,1	9,0	0,3	7,1	0,5
Kuivaine kaod, %	10,3	0,3	8,2	0,4	5,1	0,2
Aeroobne stabiilsus, h	112,8	38,9	197,4	17,3	216	0,0

Tabel 10. Punase ristiku silo fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustus- lisand	
	Keskmine, log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD
Pärmide arv	2,3	0,6	<2,0*	NA**	<2,0*	NA**
Hallituste arv	2,5	0,3	2,3	0,4	2,3	0,6
Klostriidide arv	2,2	0,3	<2,0*	NA**	<2,0*	NA**

5 * alla määramispiiri 10²

** - pole arvutatav

Silo aeroobse stabiilsuse katses püsis piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo aeroobselt stabiilne 197 tundi (p<0,01), samal ajal kui ilma silokindlustuslisandita kontrollsilos läks kuumaks 113. tunnil (tabel 9 ja joonis Fig 7).

Seega eeltoodud teostusnäites parandas heterofermentatiivne piimhappebakter *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 silo fermentatsiooni võrreldes kontrollsiloga.

5 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kasutamine suurendas silo piimhappe kontsentratsiooni, alandas silo pH-d, vähendas sööda toitainete (kuivaine) kadusid, tagas hoidla avamisel silo parema aeroobse stabiilsuse ja pikendas silo säilimisaega.

10 Näide 4. Raiheina silo fermentatsiooni kvaliteedi parandamise ja silo aeroobse stabiilsuse tagamise katse mikroorganismiga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.

Katse viidi läbi hübriidraiheinaga, mille veeslahustuvate süsivesikute sisaldus sileeritavas materjalis oli 2,85
15 protsenti. Haljasmass niideti ja seejärel närvutati 3h. Närvutatud haljasmass koristati, hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita. Teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1
20 NCIMB42149. Kolmas silo valmistati sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli järgmine: sipelghapet 42,5 protsenti, ammooniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti.
25 Keemilist silokindlustuslisandit kasutati nn positiivse kontrollina ja seda lisati sileeritavale materjalile suhtega 3 l/t. Lüofiliseeritud piimhappebakteri tüve *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 lisati sileeritavale materjalile vesilahusena kontsentratsioonis 1×10^5 pmü/g sileeritava
30 taimse materjali (sööda) kohta. Kõik katsevariandid (kontrollsilod, piimhappebakteri tüvega *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silod ja keemilise

silokindlustuslisandiga valmistatud silod) valmistati viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Katsesilode aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi ja siloproove analüüsiti näites 1 kirjeldatud meetodikate järgi.

- 5 Piimhappebakter *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 produtseeris silosse 3 korda rohkem äädikhapet (tabel 11 ja joonis Fig 4) võrreldes loodusliku piimhappebakterite populatsiooni toel fermenteerunud kontrollsilo ($p < 0,01$) vastav näitaja. Samuti sisaldas TAK 124-1 NCIMB42149 silo
- 10 enam piimhapet ($p < 0,01$) kui ilma kindlustuslisandita kontrollsilo (vastavalt 87,9 ja 48,8 g/kg kuivaines). Suurem piimhappesisaldus tagas TAK 124-1 NCIMB42149 silos madalama pH ($p < 0,01$). Erinevalt kontrollsilost piimhappebakteriga
- 15 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silos pärmseeni (tabel 12) ei leitud ($p < 0,01$). Pärmseente maha surumine ja suurem äädikhappesisaldus silos parandas sööda aeroobset stabiilsust hoidla avamisel. Piimhappebakteriga
- 20 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo temperatuur jäi aeroobse stabiilsuse katses (tabel 11 ja joonis Fig 8) stabiilseks kogu katseperioodi vältel (216 tundi). Kontrollsilo ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silod kuumenesid vastavalt 26. tunnil ja 43. tunnil. *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 parandas silo aeroobset stabiilsust võrreldes kontrollsilo ja
- 25 keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud siloga statistiliselt oluliselt ($p < 0,01$).

Tabel 11. Raiheina teise katse silo (teostusnäite 4) keemilise koostise, toiteväärtuse ja fermentatsiooni kvaliteedi näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus*

30 *brevis* TAK 124-1 NCIMB42149

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustus lisand	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	245,2	2,7	243,2	1,4	257,8	2,8
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	106,3	5,3	104,4	0,7	103,1	2,2
Toortuhk	100,8	2,2	102,2	1,6	93,2	1,6
Toorkiud	301,9	3,2	315,5	7,4	237,8	116,8
Lämmastikuta ekstraktiivained	458,0	5,3	443,6	7,6	478,5	10,8
Metaboliseeruv energia, MJ/kg	9,3	0,0	9,3	0,0	9,3	0,0
Metaboliseeruv proteiin	70,5	0,4	70,3	0,1	70,8	0,2
Etanool	40,1	12,7	57,0	27,9	6,8	3,2
Äädikhape	6,3	1,3	19,0	4,5	9,6	1,4
Propioonhape	0,3	0,0	0,4	0,0	0,6	0,1
Võihape	1,0	0,1	1,0	0,2	0,2	0,1
Piimhape	48,8	7,4	87,9	9,6	107,5	15,0
2,3-butandiool	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
pH	5,3	0,2	4,7	0,1	4,0	0,1
NH ₃ -N/üld N, %	9,7	0,3	9,5	0,3	5,5	0,6
Kuivaine kaod, %	8,5	0,3	9,5	0,2	2,7	0,8
Aeroobne stabiilsus, h	26,0	4,4	216	0,0	42,8	12,6

Tabel 12. Raiheina teise katse silo (teostusnäite 4) fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad kasutades mikroorganismi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1

5 NCIMB42149

Näitaja	Kontroll		TAK 124-1		Keemiline silokindlustuslisand	
	Keskmine, log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD	Keskmine log ₁₀	SD
Pärmide arv	5,7	0,2	<2,0*	NA**	5,4	0,5
Hallituste arv	2,4	0,9	2,1	0,3	2,4	0,9

Klostriidide arv	2,7	0,8	2,4	0,7	<2,0*	NA**
------------------	-----	-----	-----	-----	-------	------

* alla määramispiiri 10^2

** - pole arvutatav

- Leiutise teostamise 4. näites parandas piimhappebakter
- 5 *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 silo fermentatsiooni. Surudes maha silo riknemist põhjustavaid pärme, tagab *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kvaliteetse ja stabiilse silo nii säilitamisel, kui hoides ära silo kuumenemise hoidla avamisel söötmiseks.
- 10 4. teostusnäites *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 kasutamine suurendas silo piim- ja äädikhappe kontsentratsiooni, alandas silo pH-d, surus alla patogeensete mikroorganismide ja pärmseente toime, tagas silo aeroobse stabiilsuse ja pikendas silo säilimisaega.

PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149.
- 5 2. Mikroorganismi tüvi vastavalt punktile 1 lüofiliseeritud kujul.
3. Punktile 1 - 2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav sööt.
4. Sööt vastavalt punktile 3, milleks on fermenteeritud
- 10 sööt.
5. Sööt vastavalt punktile 4, milleks on silo.
6. Punktile 1 - 2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav kompositsioon.
7. Punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine
- 15 söödalisandina.
8. Punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine silo aeroobse stabiilsuse tagamiseks.
9. Punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine sööda fermenteerimiseks.
- 20 10. Punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine sööda fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kaduse vähendamiseks.
- 25 11. Punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine sööda fermenteerimisel patogeensete mikroobide toime allasurumiseks ja pärmseente kasvu pidurdamiseks, mis seisneb punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi tüve lisamises fermenteeritavale söödale.
- 30 12. Kasutamine vastavalt punktile 11, kus patogeenseteks mikroobideks on klostriidid ja enteropatogeenid.

13. Meetod sööda säilimisaja pikendamiseks, kus fermenteerimisel lisatakse söödale punktile 1 - 2 vastavat mikroorganismi tüve.

1/8

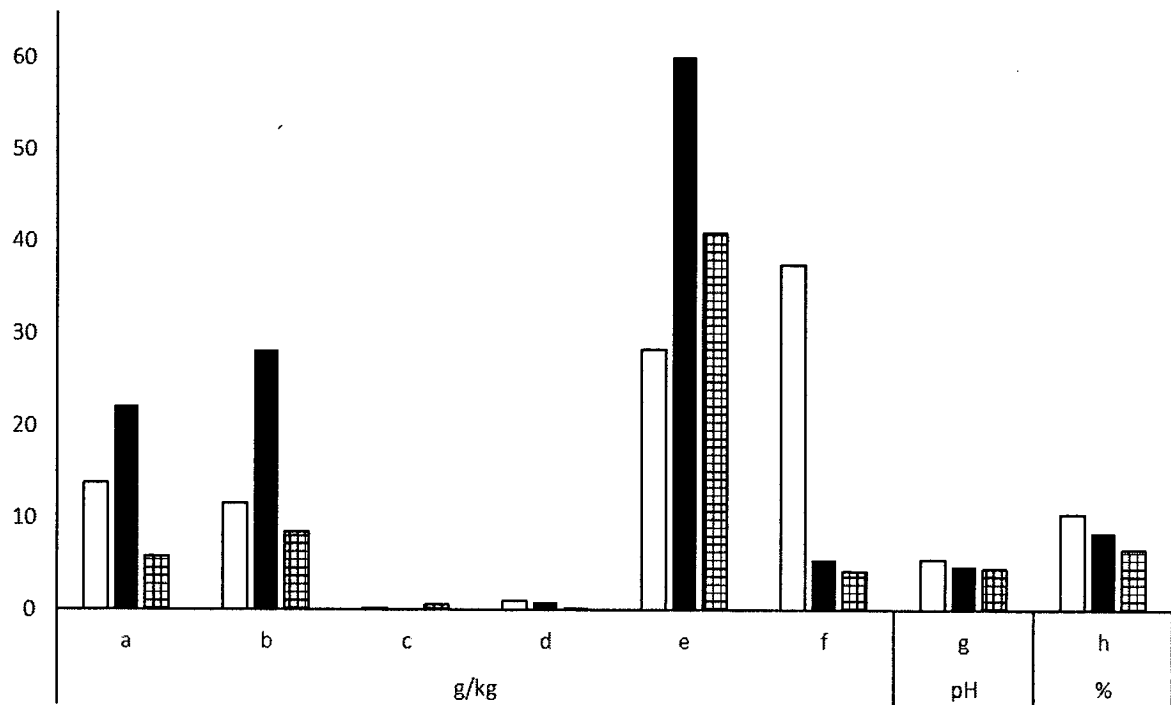


Fig. 1

□ -kontrollsilu

■ - bakteriga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silu

▣ - keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silu

2/8

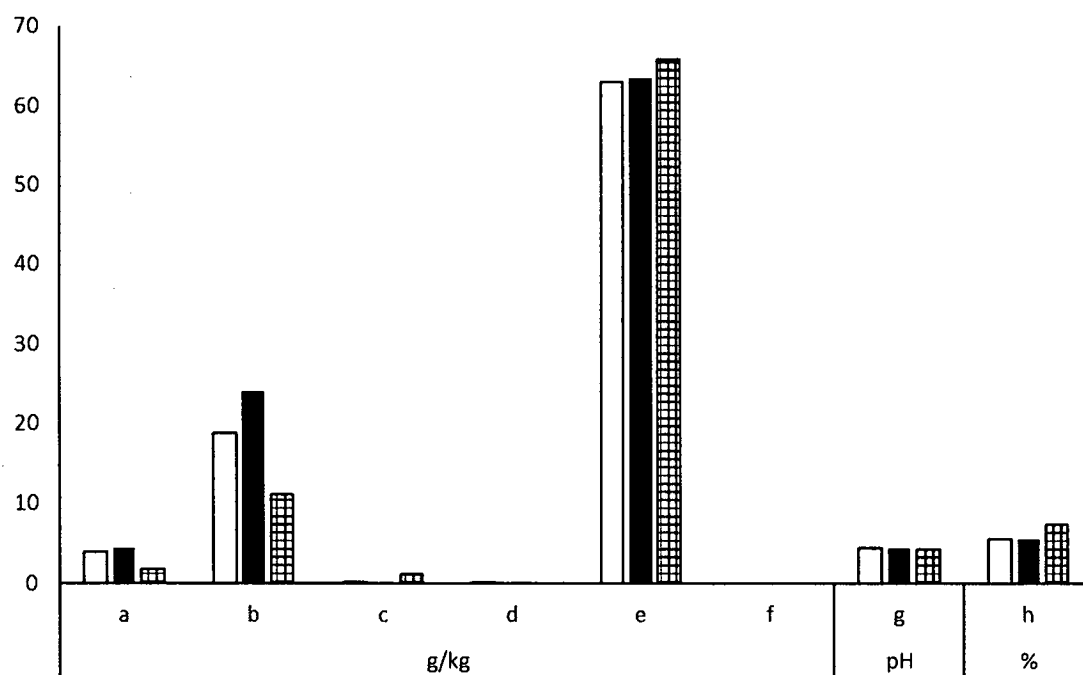


Fig. 2

□ - kontrollsilu

■ - bakteriga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silu

▣ - keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silu

3/8

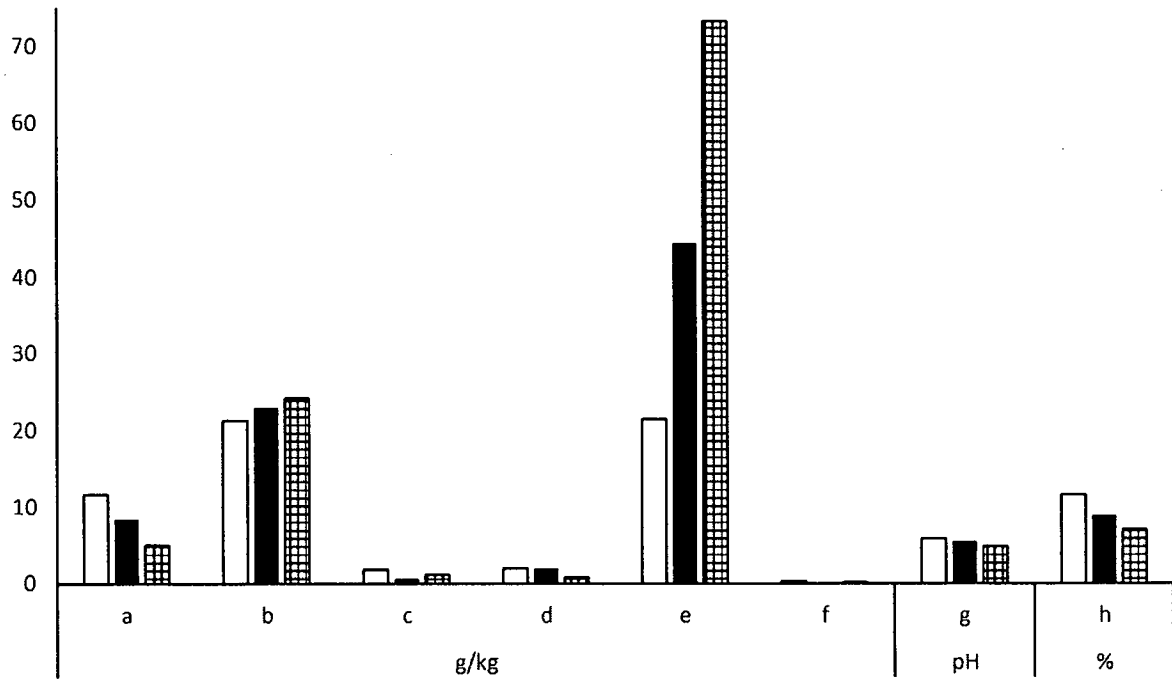


Fig. 3

□ - kontrollsilu

■ - bakteri *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silu

▣ - keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silu

4/8

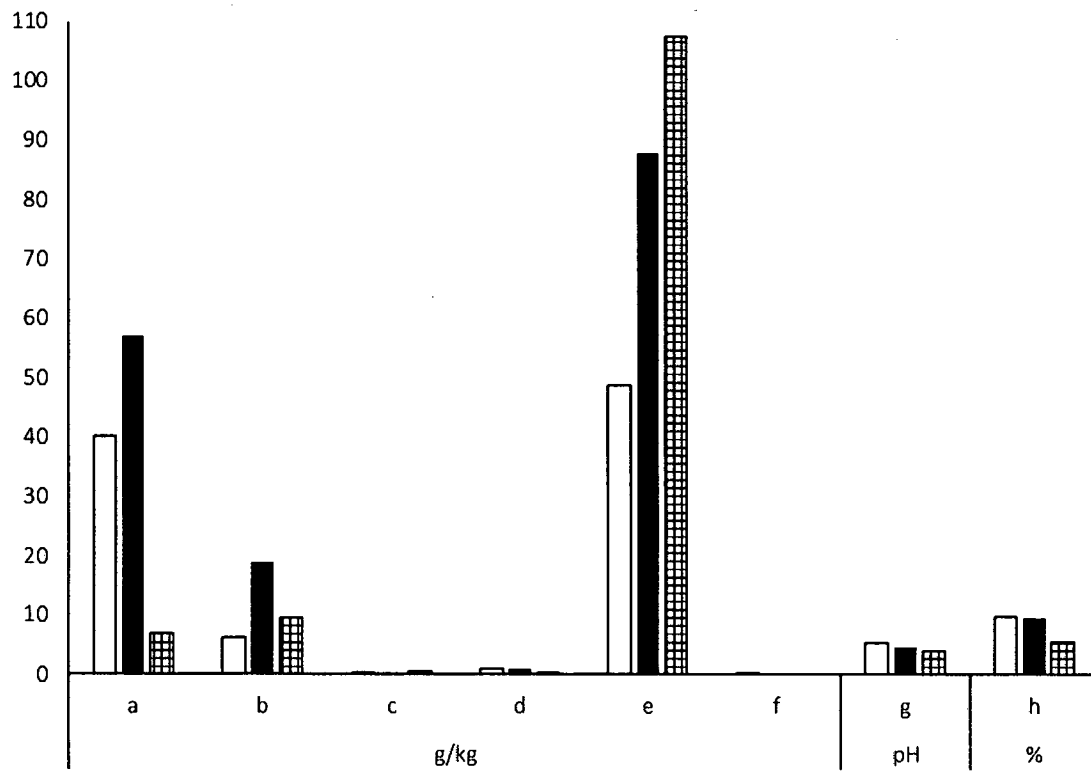


Fig. 4

□ - kontrolsilu

■ - bakteriga *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 valmistatud silo

▣ - keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo

5/8

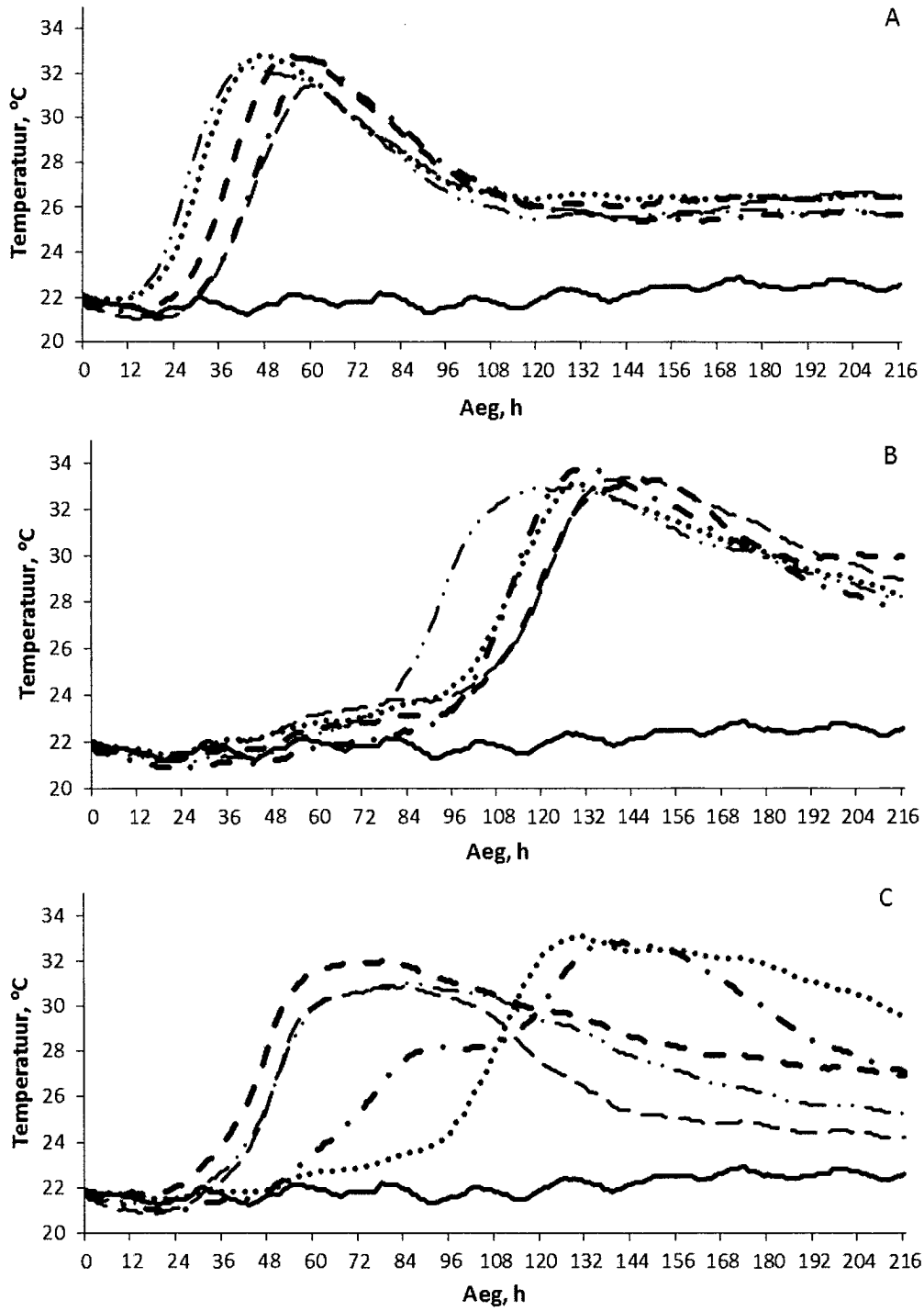


Fig. 5

- - Ambientne temperatuur °C
- - kordus 1; - - - - kordus 2;
- . - kordus 3; - - - - kordus 4; - · - · - kordus 5

6/8

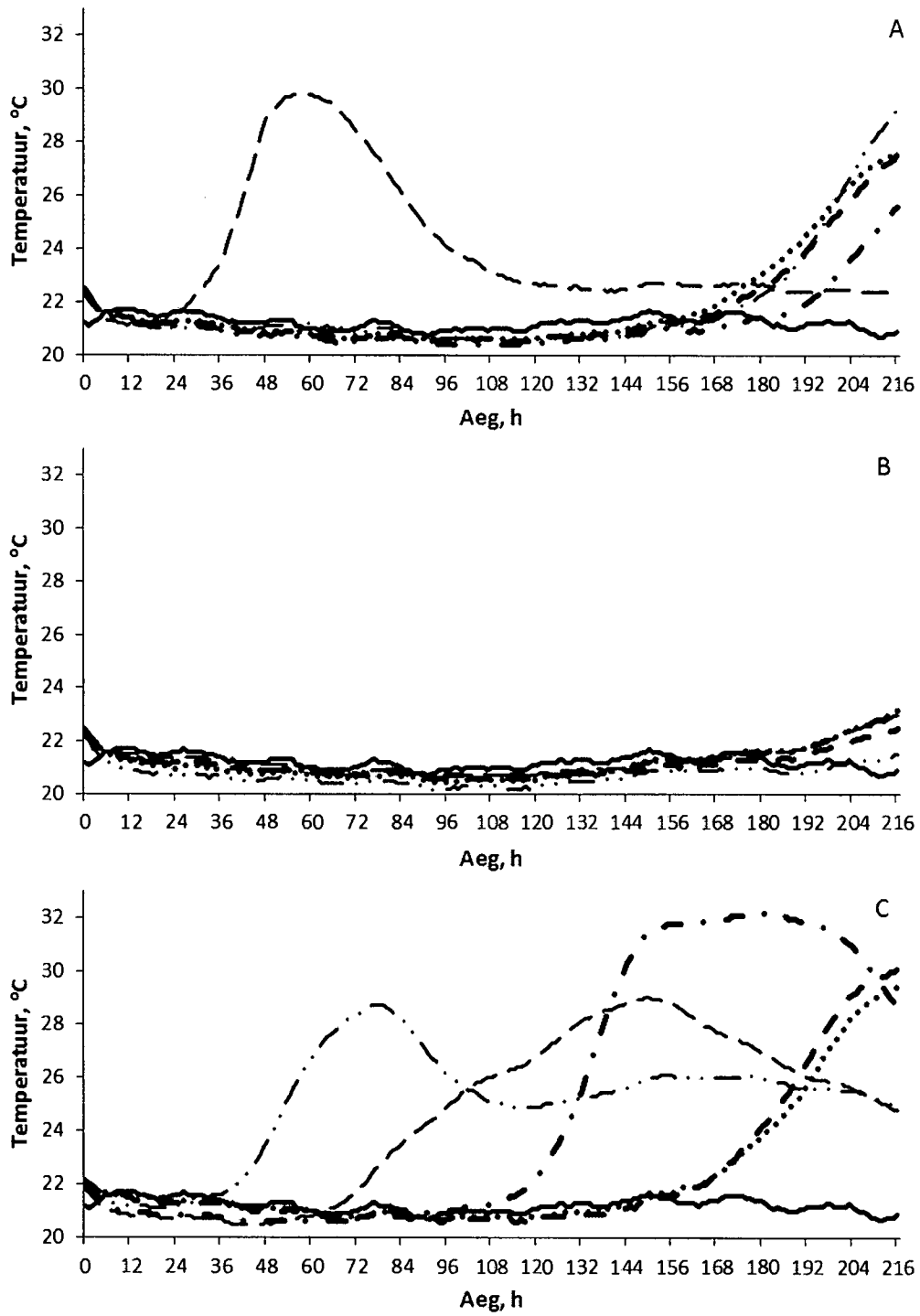


Fig. 6

- - Ambientne temperatuur °C;
- - kordus 1; - - - - - kordus 2;
- . - . - kordus 3; - - - - - kordus 4; - · - · - kordus 5

7/8

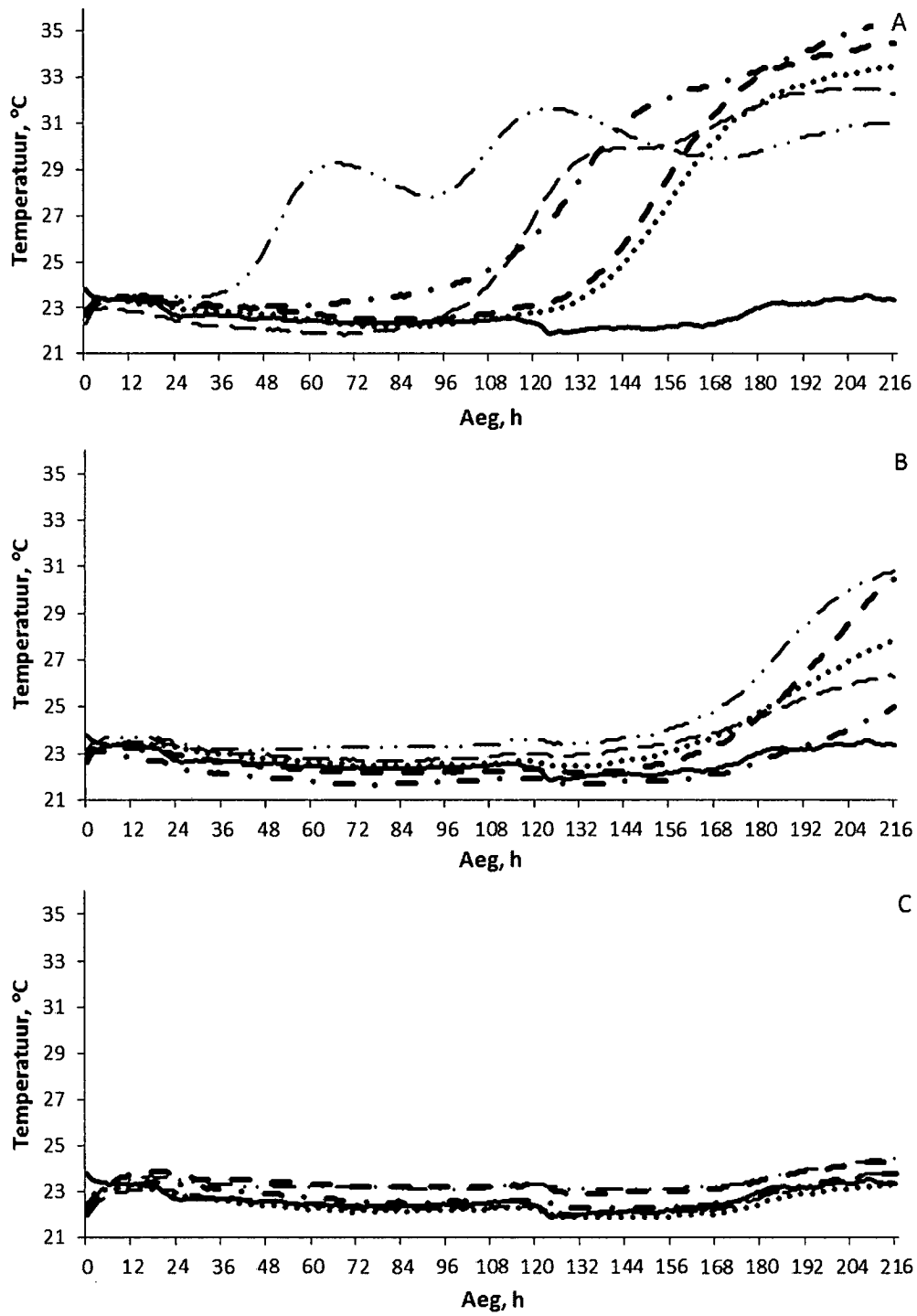


Fig. 7

- Ambientne temperatuur °C;
- - kordus 1; - - - - - kordus 2;
- . - . - kordus 3; - - - - - kordus 4; - · - · - kordus 5

8/8

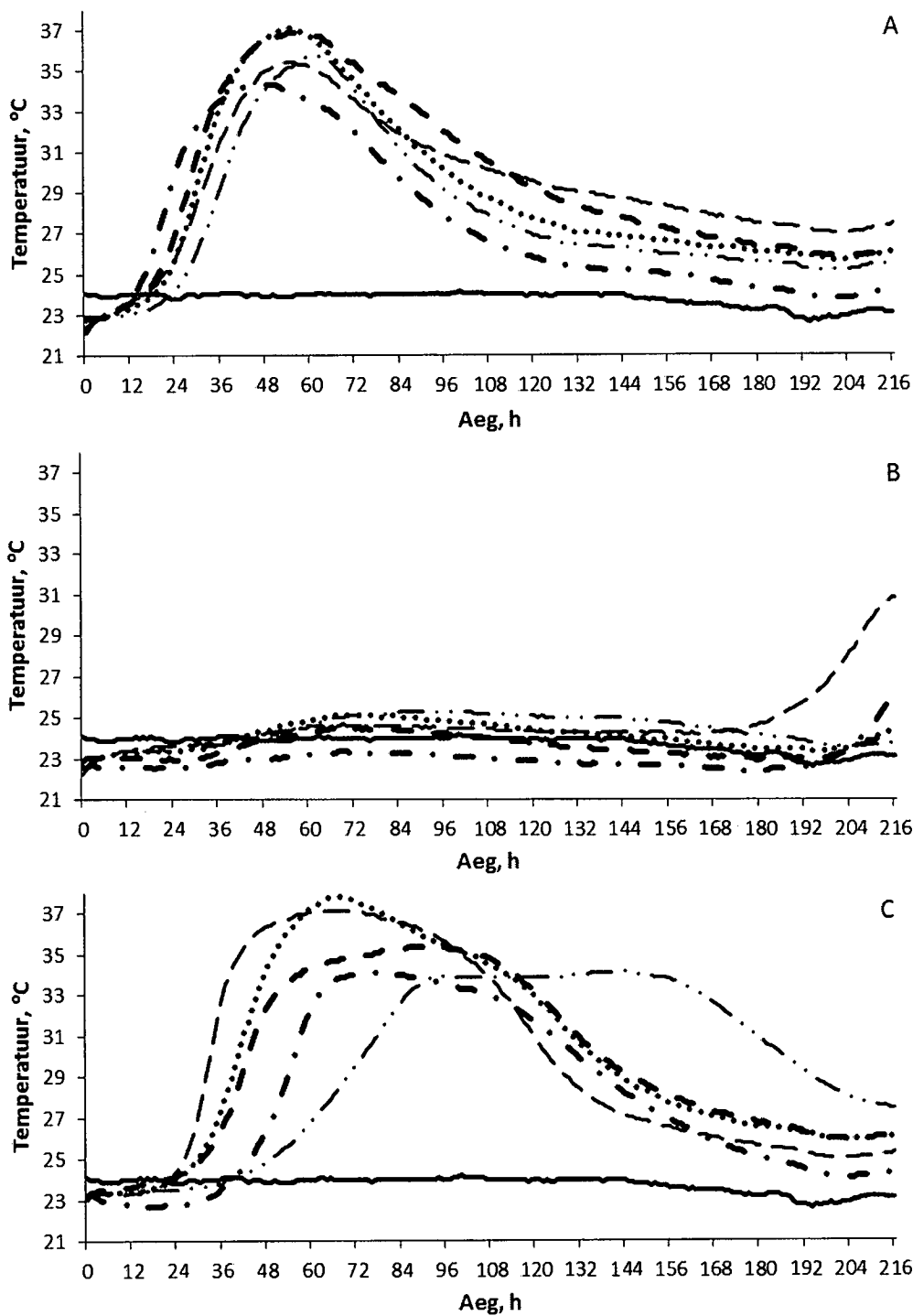


Fig.8

- - Ambientne temperatuur °C;
- - kordus 1; - - - - kordus 2;
- . - . - kordus 3; - - - - kordus 4; - - - - kordus 5