

(19)



(10) **LT 6270 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6270** (51) Int. Cl. (2016.01): **A23K 1/00**
C12N 1/00
- (21) Paraiškos numeris: **2014 109**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2014-09-24**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-04-11**
- (45) Patento paskelbimo data: **2016-05-10**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Elena BARTKIENĖ, LT
Gražina JUODEIKIENĖ, LT
Ramūnas GARBARAVIČIUS, LT
- (73) Patento savininkas:
UAB „Baltijos biotechnologijos“, A. Tumėno g. 4-38, LT-01109 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Vaclovas KIŠKIS, Adomaičiai, Lavoriškių p-tas, LT-15032 Vilniaus raj., LT

- (54) Pavadinimas:
Probiotiniai fermentuoti pašarų priedai

- (57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su biotechnologijomis, ir skirtas pašarų gamybos sričiai ir gali būti taikomas gaminti didelio antimikrobinio aktyvumo fermentuotų pašarų priedus, pašarų papildus, pašarų premiksus, pašarų žaliavas bei kombinuotus pašarus. Siūloma fermentuotų pašarų gamybai naudoti iš spontaninių Lietuvoje užaugintų grūdinių raugų išskirtas pieno rūgšties bakterijų (PRB) padermes *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ir/arba *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481. Aprašytas PRB identifikavimas, jų metabolizmo produktų antimikrobinis poveikis pataloginėms bakterijoms ir mikroskopiniams grybams. Pasiūlyta jų gausinimo terpė. Pateikti fermentuotų pašarų panaudojimo pavyzdžiai atrajojančių gyvulių sveikatos gerinimui ir produktyvumo kėlimui.

Technikos sritis

Šis išradimas yra susijęs su biotechnologijomis, ir skirtas pašarų gamybos sričiai ir gali būti taikomas gaminti didelio antimikrobinio aktyvumo preparatus – fermentuotų pašarų priedus, pašarų papildus, pašarų premiksus, pašarų žaliavas bei kombinuotus pašarus.

Technikos lygis

Pastaruoju metu pašarų gamyboje yra siūloma naudoti probiotinius preparatus, kurių sudėtyje yra pieno rūgšties bakterijų (PRB). PRB paprastai laikomi naudingi (ne patogeniniai) mikroorganizmai, kurie gyvena įvairiose aplinkose, tokiose kaip – dirvožemio, augalų, vabzdžių, gyvūnų ir žmogaus mikrofloroje. Šie mikroorganizmai yra antagonistiški puvimo mikroflorai, taip pat išskiria pieno rūgštį ir antibiotikams tapačias medžiagas – bakteriocinus arba į bakteriocinus panašias medžiagas. Pieno rūgšties bakterijos skatina B grupės vitaminų (biotino, tiamino, riboflavino, nikotininės rūgšties, vitamino B12) ir vitamino K sintezę. Pieno rūgšties bakterijos geriausiai auga, kai terpės pH yra 4-5. Jos veikia daugelį patogeninių bakterijų: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pasteurella*, *Bacillus* ir *Staphylococcus*. Pieno rūgšties bakterijų probiotikai normalizuoja gyvulių virškinamo trakto mikroflorą, stimuliuoja virškinimo procesus, padeda organizmui pasisavinti pašaro maistingąsias medžiagas, daro įtaką gyvulių rezistentiškumui infekcijoms ir produktyvumui.

Viena iš perspektyviausių PRB yra *Pediococcus spp.* bakterijų gentis ir ypač dvi tos genties artimai susietos grupės bakterijos *Pediococcus pentosaceus* ir *Pediococcus acidilactici*.

Trumpas jų morfologinis apibūdinimas yra pateikiamas žinyne (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.3, Firmicutes, Springer, 2009 p.p. 518,519). Yra žinoma apie šių bakterijų panaudojimą fermentuotų pašarų gamyboje.

Žinomas sausų (kietų) fermentuotų pašarų gamybos būdas (žiūr. patentą WO2013029682).

Jame fermentuotų pašarų gamyboje siūloma naudoti vieną ar kelias PRB iš grupės *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*,

Pediococcus acidilactili ir *Pediococcus pentosaceus*. Šiame išradime plačiai aprašytas fermentuotų pašarų džiovavimo būdas ir įrenginys.

Šio išradimo trūkumas – aukšta fermentuotų pašarų džiovavimo temperatūra, paduodamo į džiovavimo kamerą oro temperatūra yra daugiau kaip +120°C, o išdžiovintų fermentuotų pašarų temperatūra yra daugiau kaip +40°C – kas labai mažina probiotinių bakterijų gyvybingumą.

Taip pat žinomi homofermentuoti skysti pašarai ir jų gamybos būdas (žiūr. patentą EP2056681). Jame fermentuotų pašarų gamyboje siūloma naudoti tas pačias PRB kaip aukščiau aptartame išradime, dar gi nurodomos konkrečios PRB padermės *Enterococcus faecium* MCIMB 30122, *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 30121, *Lactobacillus plantarum* LSI (NCIMB 30083), *Pediococcus acidilactili* NCIMB 30086 ir *Pediococcus pentosaceus* HTS (LMG P-22549).

Aprašytas gamybos būdas ir receptūros netinka sausų fermentuotų pašarų gamybai.

Artimiausias analogas siūlomam išradimui yra aprašytas patente US20140037786. Tai sausų fermentuotų pašarų gamybos būdas kuriame naudojamos PRB padermės *Enterococcus faecium* MCIMB 30122, *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 30121, *Lactobacillus plantarum* LSI (NCIMB 30083), *Pediococcus acidilactili* NCIMB 30086 ir *Pediococcus pentosaceus* HTS (LMG P-22549).

Išradimo esmė

Išradimo tikslas – didelio biologinio aktyvumo fermentuotų pašarų priedų gavimas panaudojant naujai atrinktas PRB padermes, išskirtas iš savaiminiu būdu fermentuotos grūdinės žaliavos. Šis tikslas pasiekiamas panaudojant atskirai arba kartu fermentuotų pašarų priedų gamyboje PRB *Pediococcus acidilactici* BaltBio 01 MSCL P1480 ir/arba *Pediococcus pentosaceus* BaltBio 02 MSCL P1481. Toliau bus naudojamas sutrumpintas PRB žymėjimas nenurodant registracijos įstaigos ir registracijos numerių.

Lietuvoje auginamų grūdinių kultūrų (rugių, kviečių, miežių, avižų) aplinkoje

dominuoja *Pediococcus* ir *Lactobacillus* genčių PRB, kurios pereina į šių kultūrų spontaninius raugus ir juose savaiminiai dauginasi. Bakterinių kultūrų izoliatuose iš šių raugų dominuoja *Pediococcus* ir *Lactobacillus* genčių pieno rūgšties bakterijos: 39 % - *P. pentosaceus*, po 18 % - *P. acidilactici* ir *L. farciminis*, 7 % - *L. curvatus*, 2 % - *L. sakei* ir 16 % - nežinomos rūšies *Lactobacillus* spp. Buvo nustatyta, kad spontaniniuose ruginiuose rauguose 67 % bakterijų yra antibakteriškai aktyvios ir gamina skirtingus bakteriocinus.

BaltBio pieno rūgšties bakterijų išskyrimas

BaltBio pienarūgščių bakterijų padermės išgautos (izoliuotos) iš savaiminiu būdu fermentuotų Lietuvoje užaugintų varpinių grūdų raugų. Padermių izoliavimo techninius darbus pagal sutartis atliko UAB Bioseka. Padermes identifikavo UAB Biosta.

Raugai gaminti laboratorinėmis sąlygomis, keičiant terpės drėgnį ir fermentacijos temperatūrą. Raugai buvo ruošti iš 1370 tipo ruginių miltų bei avižų miltų ir vandens santykiu 1:1 arba 1:2, temperatūra buvo cikliška keičiama ribose (25-35) °C.

10 g raugo sumaišyta su 90 ml fiziologinio tirpalo (0,9 % NaCl (Balkanpharma-Troyan AD, Troyan, Bulgarija)) homogenizatoriuje BagMixer® 400 P (Interscience for microbiology, Prancūzija). Iš gautos suspensijos ruošti nuo 10^{-2} iki 10^{-5} skiediniai. Atitinkamai 10^{-4} ir 10^{-5} skiediniai pasėti į Petri lėkšteles su mMRS agaru. Lėkštelės laikytos 25 °C, 30 °C arba 35 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Po trijų parų tikrintas ir nustatytas PRB kolonijas sudarančių vienetų skaičius grame raugo (KSV/g). Atsitiktinai pasirinktos bakterijų kolonijos (iš kiekvieno raugo mėginio išskirta po 30 PRB (iš viso 270)) išgrynintos persėjant į naujas lėkšteles. Bakterijų kultūros laikytos - 40 °C ir - 80 °C temperatūroje.

Modifikuota MRS terpė (mMRS) ruošta, ištirpinant po 10,0 g triptono peptono ir mėsos ekstrakto, po 5,0 g mielių ekstrakto ir natrio acetato, po 7,0 g gliukozės, fruktozės ir maltozės, po 2,0 g natrio gliukonato, K_2HPO_4 ir trisamonocitrato, 1,0 ml tvino 80, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,05 g $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 0,5 g cisteino chlorido, 15,0 g agaro 1 l distiliuoto vandens. Gautas tirpalas (pH 6,3) sterilizuotas 15 min 121 °C temperatūroje.

MRS agaro terpė (MRS) ruošta, ištirpinant 66,2 g MRS agaro 1 l distiliuoto

vandens. Gautas tirpalas virtas, kol agaras visiškai ištirps ir sterilizuotas 15 min 118 °C temperatūroje.

BaltBio pieno rūgšties bakterijų identifikavimas

PRB charakterizuotos nustčius jų morfologiją, atlikus angliavandenių fermentacijos ir augimo skirtingose temperatūrose testus.

Atlikus Gram reakcijos ir katalazės testus nustatyta, kad iš devynių savaiminių raugų mėginių identifikavimui pasirinktos 67 tiriamos PRB buvo gramteigiamos ir negamino katalazės, kaip būdinga PRB. Mikroskopinių tyrimų rezultatai parodė, kad 31 padermė buvo lazdelės formos, o 36 padermės – rutuliškos formos (kokai).

Pagal sacharozės ir maltozės fermentavimą kokai buvo padalinti į dvi grupes: 1 grupei priklausė 26, o antrai - 10 bakterijų padermių. Visos rutuliškos bakterijos hidrolizavo trehalozę ir gliukozę. Žinoma, kad *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici* skirtingai fermentuoja maltozę ir trehalozę bei skiriasi galimybe augti 50°C temperatūroje, *P. pentosaceus* fermentuoja abu angliavandenius ir negali augti šioje temperatūroje, *P. acidilactici* fermentuoja tik trehalozę ir auga 50 °C temperatūroje. Atsižvelgiant į tai, kad 5 bakterijų padermės fermentavo maltozę ir trehalozę bei neaugo esant 50 °C temperatūrai, jos pripažintos kaip *P. pentosaceus*, o 4 bakterijų padermės identifiukuotos kaip *P. acidilactici*, nes jos nefermentavo maltozės, bet augo 50 °C temperatūroje.

Amplifikacijos PGR metodu buvo identifiukuotos šių 9 padermių 16S rDNR geno sekos. Jų sekų palyginimas su tarptautinio biotechnologijos informacijos centro (NCBI) bakterijų banko sekomis parodė ir patvirtino kad su ne mažiau kaip 95 % tikimybe šios PRB padermės priklauso *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*.

Joms yra duoti salyginiai pavadinimas - *P. acidilactici* BaltBio01, *P. acidilactici* BaltBio03, *P. acidilactici* BaltBio05, *P. acidilactici* BaltBio07, *P. acidilactici* BaltBio09 ir *P. pentosaceus* BaltBio02, *P. pentosaceus* BaltBio04, *P. pentosaceus* BaltBio06, *P. pentosaceus* BaltBio08.

Įvertinus išskirtų *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* padermių bakteriocinų aktyvumą į patogeninius mikroorganizmus (*Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus macerans*, *Salmonella*

enteritidis, *Micrococcus sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), kaip perspektyviausi mikroorganizmai gyvūnų sveikatingumui užtikrinti, panaudojant juos pašarų priedams ir kitiems pašariniams produktams, pasirinkti *Pediococcus acidilactici* BaltBio 01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio 02.

PRB metabolizmo produktų antimikrobinis poveikis bakterijoms

Parinktų pieno rūgšties bakterijų (PRB) *P. acidilactici* BaltBio01, *P. pentosaceus* BaltBio02 metabolizmo produktai (MP) nustatyti antimikrobiškai aktyvūs prieš įvairias patogenines bakterijas (*Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus macerans*, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Antimikrobinis PRB metabolizmo produktų poveikis prieš gram-/± bakterijas (inhibicijos zonų skersmuo agarų terpėje, mm) parodytas 1 lentelėje.

Nustatyta, kad PRB gali visiškai sustabdyti patogeninių bakterijų dauginimąsi (bakteriocidinis poveikis) arba slopinti ar dalinai stabdyti jų augimą (bakteriostatinis poveikis). Antimikrobinis PRB padermių poveikis prieš gram-/± bakterijas priklausė nuo PRB padermės ir indikatorinio mikroorganizmo. *P. acidilactici* BaltBio01 pasižymėjo bakteriocidiniu poveikiu prieš visas tiriamas indikatorines bakterijas (inhibicijos zonos skersmuo agarų terpėje nustatytas nuo 10 ± 0 iki $24,5 \pm 0,7$ mm), tuo tarpu, bakteriostatinis poveikis pasižymėjo *P. pentosaceus* BaltBio 02.

1 lentelė

Indikatorinis mikroorganizmas	<i>P. acidilactici</i> BaltBio 01	<i>P. pentosaceus</i> BaltBio 02	Tetraciklinas 30µg	Streptomicinas 10µg
<i>E. coli</i>	14,5±0,7	14,5±0,7*	17	13
<i>Ent. faecalis</i>	13±1,4	11±1,4*	29*	10*
<i>B. macerans</i>	13±0	12±0*	22	18*
<i>S. enteritidis</i>	10±0	11±1,4	20	10
<i>Micrococcus sp.</i>	24,5±0,7	25±0	30	18
<i>Listeria sp.</i>	13±1,4	10±1,4	26	0
<i>P. aeruginosa</i>	15±0	15±2,8	11	7
<i>B. thuringiensis</i>	19,3±0,5	17,7±0,5	–	17,8
Kur - * bakteriostatinis poveikis				

Didžiausias PRB antimikrobinis poveikis nustatytas *Micrococcus sp.* ir *B. thuringiensis* bakterijoms (inhibicijos zonų skersmuo agarų terpėje kito nuo $16,2 \pm 0,7$ iki 25 ± 0 mm). Antimikrobinis *P. acidilactici* BaltBio01 MP poveikis *B. thuringiensis* augimui nustatytas 8,4 % didesnis, lyginant su streptomicino antimikrobinio poveikiu *P. acidilactici* BaltBio01 pasižymėjo bakteriocidiniu poveikiu *E. coli* ir *Ent. faecalis* ($13 \pm 1,4$ mm). Bakteriostatiniu poveikiu pasižymėjo *P. pentosaceus* BaltBio02 ($11 \pm 1,4$ mm) padermė ir antibiotikai: streptomicinas ir tetraciklinas (10 ir 29 mm, atitinkamai).

PRB metabolizmo produktų antimikrobinis poveikis mikroskopiniams grybams

Vertinant PRB antimikrobinį poveikį prieš mikroskopinius grybus, kaip *Fusarium* genties atstovas buvo pasirinktas *Fusarium poae*, tuo tarpu, kaip *Aspergillus* genties atstovas pasirinktas *Aspergillus niger*. Papildomai įvertintas PRB metabolitų poveikis *Penicillium chrysogenum* grybui. Antimikrobinis PRB, o taip pat ir antigrybinių preparatų poveikis *Fusarium*, *Aspergillus* ir *Penicillium* genties mikroskopiniams grybams (inhibicijos zonų skersmuo agarų terpėje, mm) pateiktas 2 lentelėje. PRB MP pasižymėjo fungistatininiu ir fungicidiniu poveikiu *Fusarium poae* augimui, tuo tarpu, *Penicillium chrysogenum* ir *Aspergillus niger* augimui nustatytas tik fungistatinis PRB poveikis.

2 lentelė

PRB	Indikatorinis mikroorganizmas					
	<i>Fusarium poae</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	FS	FC	FS	FC	FS	FC
BaltBio01	15,3±1,0	10,0±0,8	19,5±1,0	–	11,0±1,8	–
BaltBio02	13,5±1,3	–	21,0±1,2	–	11,0±1,2	–
Antigrybiniai preparatai						
Itrakonazolis		9,5±0		7,5±0,7		–
Nistatinas		13,5±2,1		31±1,4		16,3±0,4
AFY		–		–		–
FS - fungistatinis poveikis, FC – fungicidinis poveikis.						

PRB paruošimas fermentavimui

Iki eksperimento PRB buvo laikytos $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje (Sanyo, Japonija). Atšildytos PRB pagausintos MRS agare (Sigma Aldrich, Vokietija) arba kitoje alternatyvioje terpėje, išlaikant 48 valandas *P. pentosaceus* BaltBio02 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, *P. acidilactici* BaltBio01 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki 10^8 - 10^9 PRB KSV/ml.

Grynos PRB gausinamos alternatyvioje terpėje kuri gaminama iš bulvių sulčių, jas autoklavuojant, atvėsinant iki $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir įvedant grynas PRB kultūras (į 0,5 litro sulčių / 1 ml grynų bakterijų kultūrų, pagausintų MRS buljone). Alternatyvi terpė su PRB išlaikoma $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 24; 48 ir 72 h. iki $9,60 \times 10^{10}$ PRB KSV/ml.

PRB panaudojimas fermentuotų pašarų gamyboje

Prieš fermentavimą paruoštame substrate gali būti nuo 0,5% iki 10% paruoštų fermentavimui PRB. Gali būti naudojamos *P. acidilactici* BaltBio01 arba *P. pentosaceus* BaltBio02 arba jų mišinys. Fermentavimo trukmė rekomenduojama nuo 8h iki 72h ir temperatūra nuo $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Biologiškai aktyvaus fermentuoto pašaro priedo sudėtyje turi būti nuo 10^6 iki 10^9 PRB KSV/g ir pH nuo 3,0 iki 6,0.

PRB panaudojimo pavyzdžiai

Pavyzdys 1. Pieno rūgšties bakterijų *Pedococcus acidilactici* BaltBio01 ir *Pedococcus pentosaceus* BaltBio02 mišiniu fermentuoto produkto įtakos veršelių sveikatingumui įvertinimas.

Šiuo metu plačiai taikomas intensyvus veršelių auginimas sukelia žarnyno mikrofloros disbalansą, nes virškinamajame trakte nesivysto tinkama mikroflora, kuri natūraliomis sąlygomis auginamų gyvulių virškinamajame trakte susiformuoja iš aplinkos ir gaunama su motinos pienu. Dėl įvairių priežasčių, pasikeitus plonųjų žarnų mikroorganizmų sudėčiai, pradeda daugintis žarnyno lazdelės, kurios užima pienarūgščių bakterijų (PRB) vietą.

Patogeninių bakterijų sukelta infekcija pažeidžia gleivinę, sumažėja jos apsauginės funkcijos. PRB medžiagos gali normalizuoti žarnyno mikroflora, gerinti apsaugines gleivinės savybes, skatinti maisto medžiagų pasisavinimą ir natūralų rezistentiškumą, sumažinti patirtų stresų padarinius.

Teigiama, kad PRB dėka galvijų jaunikliai greičiau pradeda savarankiškai virškinti augalinės kilmės pašarus, geriau pasisavintų augalinius baltymus ir kitas maistingąsias medžiagas.

Lyginant intensyviai ir normaliai auginamus gyvulius, nustatyta kad fiziologinės virškinamojo trakto savybės pasikeičia tuomet, kai žūva normali mikroflora. Dėl silpniau besivystančio žarnyno sumažėja jo masė, susikaupia per daug skysčių aklojoje ir storosiose žarnose ir veršeliai gali susirgti enteritu ir diarėja.

Bandymui buvo atrinkta 14 veršelių: bandomoji grupė (n=6) ir kontrolinė (n=8). Veršeliai buvo atrinkti analogų principu pagal amžių, laikomi vienodomis sąlygomis, girdomi karvių pienu tris kartus per parą, šeriami specialiu kombinuotu pašaru. Bandomoji grupė 14 dienų, rytinio girdymo metu (apie 07:00 val.), gavo probiotikų mišinį, įpilant po 50 ml į pieną. Bandymo pradžioje (0 d.) ir pabaigoje (14 d.) kraujo dujų analizatoriumi „Epoc“ (EPOC, Kanada) buvo tiriami šie parametrai: pH; PCO₂; PO₂; Na; K; iCa; Glu; Laktatai; Hct; HC0₃; TC0₂; cS0₂; Hb. Kraujo biocheminiu analizatoriumi „Hitachi 705“ (Hitachi, Japonija), naudojant „DiaSys“ (Diagnostic Systems GmbH, Vokietija) reagentus, ištirtas kraujo fermentas aspartataminotransferazė (AST). Bandymo pradžioje ir pabaigoje buvo fiksuojama veršelių svoris. Nustatyta, kad tyrimo metu statistiškai patikimai (p<0,05) kito šie kraujo parametrai: pH; PCO₂, laktatai, AST, leukocitai, limfocitai bei veršelių priesvoris. Bandymų rezultatai parodyti 3 lentelėje.

3lentelė

Parametras	Kontrolinė grupė		Bandomoji grupė	
	Bandymų pradžia	Bandymų pabaiga	Bandymų pradžia	Bandymų pabaiga
Kraujo pH	7,36	7,361	7,33	7,28
PCO ₂	63,95	70,93	63,08	60,71
Laktatai	3,95	4,29	3,2	2,64

AST, TV/l	50,18	58,9	49,82	33,1
Leukocitai, *10 ⁶	10,69	10,32	9,37	11,43
Limfocitai, *10 ⁹ /l	4,57	5,55	4,57	6,39
Priesvoris, kg	35,75	49	34,37	45,25

Šeriant PRB *P. acidilactici* BaltBio01 ir *P. pentosaceus* BaltBio02 mišiniu 14 dienų po 50 ml:

sumažėjo rizika susirgti acidoze (stabilizuojasi kraujo pH, sumažėja laktatų, PCO₂ koncentracija);

sumažėjo kepenų pažeidimų rizika (sumažėjo AST koncentracija);

sustiprėjo organizmo imunitetas (padidėja limfocitų ir leukocitų skaičius kraujyje),

kiti parametrai nepasikeitė.

Pavyzdys 2. Pieno rūgšties bakterijų *P. acidilactici* BaltBio01 ir *P. pentosaceus* BaltBio02 mišiniu fermentuoto produkto įtakos karvių sveikatingumui įvertinimas.

Bandymui, analogų principu, buvo atrinkta po 20 bandomųjų ir kontrolinių, užtrūkusių karvių, kurioms iki numatomo apsiveršavimo buvo likę 30 dienų. Bandomosios grupės karvėms buvo šeriama pieno rūgšties bakterijų *P. acidilactici* BaltBio01 ir *P. pentosaceus* BaltBio02 mišiniu fermentuoto produkto (kiekis karvei 0,3 kg/per parą).

Prieš užtrukinimą ir po apsiveršavimo buvo fiksuojama: pieno sudėtis (riebumas %, baltymingumas %, laktozė %, somatinių ląstelių skaičius, (SLS) tūkst./ml), šlapalas, (mg/proc.). Penkias savaites po apsiveršavimo buvo fiksuojamas pieno kiekis per parą (kg/d.). Kraujas biocheminiam ir morfologiniam tyrimui buvo imamas likus 30 parų iki apsiveršavimo ir po apsiveršavimo praėjus 1 parai. Nustatyta, kad tyrimo metu statistiškai patikimai ($p < 0,05$) kito SLS, pieno kiekio, bei fermento ALT koncentracijos.

4 lentelė

Parametras	Kontrolinė grupė		Bandomoji grupė	
	Bandymų pradžia	Bandymų pabaiga	Bandymų pradžia	Bandymų pabaiga
SLS, 10 ³ /ml	638	602	573	114
Pienas, kg	22,28	27,14	19,17	30,79
Fermentas ALT, TV/l	28,2	21,18	24,75	13,21

Rezultatai. Šeriant PRB *P. acidilactici* BaltBio01 ir *P. pentosaceus* BaltBio02 mišiniu fermentuotas produktas turėjo įtakos mažinant bandomųjų karvių sergamumo subklininiais mastitais riziką - dėl karvių pieno SLS sumažėjimo. Taip pat padidėjo primelžiamo pieno kiekis ir pagerėjo jo kokybė.

Pavyzdys 3. Pieno primilžiai ir cheminė sudėtis, karves šeriant *Pediococcus pentosaceus* priedu.

Pagausintos ir paruoštos fermentacijai PRB *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 Lietuvos juodmargių karvių šėrimo eksperimento metodika.

Tyrimai atlikti su holšteinizuotomis Lietuvos juodmargėmis karvėmis tvartiniu laikotarpiu. Atsižvelgiant į amžių, laktacijos tarpsnį, primilžius, karvės suskirstytos į dvi grupes: kontrolinę (n=10) ir bandomąją (n=10). Visos karvės buvo šeriamos pagal proteinų ir energijos poreikius subalansuotu racionu, atitinkančiu karvių mitybos fiziologines normas.

Bandomosios karvės buvo šeriamos tuo pačiu racionu. Tačiau kartu su pašaru šios karvės kiekvieną dieną 56 d. gavo 100 g tiriamojo priedo, kurį sudarė *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 ir ekstruduoti kviečių miltai kuriame PRB kiekis $5,0 \times 10^8$ KSV/g.

Pieno primilžiai tiriamuoju laikotarpiu buvo nustatomi tris kartus, t.y. tyrimo pradžioje, tyrimo viduryje (praėjus pusei tiriamojo laiko) bei tyrimo pabaigoje, atliekant kontrolinius karvių melžimus. Natūralaus riebumo pieno kiekis perskaičiuotas į 4 proc. riebumo (koreguoto) pieno kiekį, vadovaujantis koeficientais. Pieno mėginiai buvo

paimti iš kiekvienos karvės individualiai pagal pieno mėginių ėmimo taisykles (LST EN ISO 707:1999+P:2003 Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo taisyklės) tyrimo pradžioje, viduryje ir pabaigoje. Mėginiuose buvo nustatyti pieno riebalai, baltymai, laktozė ir urėja prietaisu „LactoScope FTIR“ (FT1.0. 2001; Delta Instruments, Olandija) bei somatinių ląstelių skaičius (SLS) prietaisu „SomaScope“ (CA-3A4, 2004; Delta Instruments, Olandija).

Tyrimų duomenys apdoroti statistinės analizės metodu (Venables and Smith, 2005). Apskaičiuoti požymių aritmetiniai vidurkiai ir jų paklaidos, patikimumo laipsnis $p < 0,05$.

Pieno primilžiai ir cheminė sudėtis, karves šeriant *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 priedu parodyti 5 lentelėje.

5 lentelė

Rodiklis	Kontrolinė grupė			Bandomoji grupė		
	1	2	3	1	2	3
Pienas, kg/d	15,86	15,08	16,60	18,04	18,87	22,38
4% koreguotas pieno kiekis, kg/d	17,22	16,94	17,83	19,17	19,88	23,43
Riebalų kiekis, %	4,5	4,69	4,56	4,41	4,42	4,40
Riebalų kiekis, kg/d	0,73	0,73	0,75	0,80	0,82	0,97
Laktozės kiekis, %	4,44	4,46	4,38	4,46	4,54	4,46
Laktozės kiekis, kg/d	0,71	0,70	0,74	0,80	0,85	1,0

Naudojant *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 priedą, piene statistikai reikšmingai padidėjo riebalų ir laktozės kiekiai. Riebalų kiekis bandomosios grupės karvių piene bandymo pabaigoje buvo 0,22 kg/d didesnis ($p < 0,05$) nei kontrolinės grupės piene ir 0,17 kg/d didesnis ($p < 0,05$) nei tos pačios grupės bandymo pradžioje. Laktozės kiekis bandomosios grupės karvių piene bandymo pabaigoje buvo 0,26 kg/d didesnis ($p < 0,05$) nei kontrolinės grupės piene ir 0,2 kg/d didesnis ($p < 0,05$) nei tos pačios grupės bandymo pradžioje. Baltymų, šlapalo kiekiai ir SLS bandymo pradžioje ir pabaigoje skyrėsi nežymiai ($p > 0,05$).

Išskirtos iš lietuviškos grūdinės žaliavos ir ištirtos PRB padermės *P. acidilactici*

BaltBio01 ir *P. pentosaceus* BaltBio02 yra mikrobiologiškai saugesnės, pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu ir gerina gyvūnų sveikatą, didina jų produktyvumą ir sėkmingai gali būti naudojamos fermentuotų pašarų gamyboje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Pieno rūgšties bakterijų padermės *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 kaip pradinio fermentacijos mikroorganizmo panaudojimas fermentuotuose pašarų prieduose, papilduose, premiksuose, pašarų žaliavose bei kombinuotuose pašaruose.

2. Pieno rūgšties bakterijų padermės *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481 kaip pradinio fermentacijos mikroorganizmo panaudojimas fermentuotuose pašarų prieduose, papilduose, premiksuose, pašarų žaliavose bei kombinuotuose pašaruose.

3. Panaudojimas pagal 1 ir 2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentuotų pašarų priedų gamybai naudoja pieno rūgšties padermių *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481 mišinius.

4. Pašarų priedas, papildas, premiksas, žaliava kurio sudėtyje yra *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ir/arba *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481 pagal 1-3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad grynos PRB gausinamos alternatyvioje terpėje kuri gaminama iš bulvių sulčių, jas autoklavuojant, atvėsinant iki 30 °C produktą ir įvedant grynas pagausintas PRB kultūras (į 0,5 litro sulčių / 1 ml grynų grynujų bakterijų kultūrų, pagausintų MRS buljone) ir išlaikant 32 °C temperatūroje nuo 24h. iki 72 h. iki $9,60 \times 10^{10}$ PRB KSV/ml.