



(10) **LT 6271 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6271** (51) Int. Cl. (2016.01): **A23K 1/00**
C12N 1/00
- (21) Paraiškos numeris: **2014 110**
- (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:
Augalinės kilmės fermentuoti pašarai

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su biotechnologijomis, ir skirtas pašarų gamybos sričiai ir gali būti taikomas didelio antimikrobinio aktyvumo augalinės kilmės fermentuotus pašarų gamybai. Siūloma sausų fermentuotų pašarų gamybai naudoti iš Lietuvoje užaugintų grūdinių kultūrų raugų išskirtas pieno rūgšties bakterijų padernes *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ir/arba *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481. Siūlomos substratų sudėtys ir gamybos technologijos ypatumai. Pasiūlyta optimali substrato sudėtis skirta atrajojančių gyvulių šėrimui. Pateiktos produktų fermentacijos, džiovavimo, formavimo ir saugojimo sąlygos, nurodytos gatavų produktų bioaktyviosios savybės, tokios kaip pieno rūgšties bakterijų kolonijas sudarančių vienetų skaičius (KSV). Nustatytos KSV reikšmės ir jų pokyčiai gamyboje ir saugojime.

Technikos sritis

Šis išradimas yra susijęs su biotechnologijomis, skirtas pašarų gamybos sričiai ir gali būti taikomas gaminti didelio antimikrobinio aktyvumo augalinės kilmės fermentuotus pašarus.

Technikos lygis

Šiuolaikinėje gyvulininkystėje vis plačiau pradedami naudoti sausi fermentuoti pašarai. Sausų kietų pašarų gamyboje naudojama taip vadinama kietos fermentacijos (KF) technologija. KF technologija yra ekonomiškesnė (fermentacijai naudojama paprastesnė, mažesnio tūrio įranga), saugesnė (esant mažam substrato vandens aktyvumui fermentacijos metu sumažėja mikrobiologinė tarša), todėl KF yra inovatyvi technologija, lyginant ją su įprasta fermentacija skystoje fazėje.

Labai svarbu, kad fermentuotuose pašaruose, kuriuose yra mažas drėgmės kiekis, tarp jų KF technologija paruoštuose sausuose pašaruose būtų pakankamas kiekis pienarūgščių bakterijų (PRB). Yra žinoma, kad KF technologija paruošti sausi fermentuoti pašarai lėčiau genda (juose mažesnis patogeninių bakterijų kolonijas sudarančių vienetų skaičius) bei jų maistinė vertė yra geresnė). Įvairūs mikroskopiniai grybai yra pagrindinė fermentuotų pašarų gedimo priežastis. Kai kurios mikroskopinių grybų rūšys gali sukelti gyvūnams rimtus susirgimus, nes jų produkuojami metabolitai yra labai toksiški. Ypač aktuali didelio drėgmės kiekio pašarų (skystų pašarų) mikrobiologinio gedimo problema.

Didelį PRB kiekį turinčių pašarų vartojimas sumažina patogeninius organizmus įvairių naminių gyvulių virškinamajame trakte. Dažniausiai, pašaras su PRB gyvūnams pateikiamas skystoje formoje, tačiau, dėl to, kad daugelis gyvūnų negali vartoti skysto pašaro yra perspektyvu jį gaminti sausoje formoje.

Sausų fermentuotų pašarų gamybai paprastai yra naudojami tradiciniai džiovavimo metodai, kuriais iš pusiau skystų pašarų terminio apdorojimo būdu pašalinama drėgmė, gaunant sausą fermentuotą pašarą. Pastarieji džiovavimo metodai (žiūr. patentą WO2013029682) veikia esant labai aukštai temperatūrai, todėl sumažina PRB ir kitų probiotinių bakterijų gyvybingumą pašaruose. Dėl šių priežasčių, siekiant užtikrinti fermentuotų pašarų veiksmingumą labai svarbu parinkti tinkamas jų gamybos

sąlygas ir užtikrinti pakankamą PRB koncentraciją juose. Svarbus ne tik PRB pakankamas kolonijas sudarančių vienetų skaičius pašaruose, bet ir pašarų saugos užtikrinimas patogeninių bakterijų minimizavimo aspektu.

Žinomas sausas probiotinis pašarų priedas, turintis pieno rūgšties bakterijų *Streptococcus lactis* 3186 K 12 VKPM B-4989, *Lactobacillus casei* MB VKPM B-4486 ir *Lactobacillus acidophilus* M86 VKPM B-4992 ir naudojamas atrajojančių gyvūnų žarnyno mikroflorai gerinti (žiūr. patentą RU2063755). Šio probiotinio pašarų priedo trūkumas tas, kad jis nėra pakankamai veiksmingas naikinant gyvūnų patogenines bakterijas, nes jame yra specifinės PRB padermės, nepakankamas PRB kiekis, be to, PRB yra mažesnio biologinio aktyvumo.

Taip pat žinomas biologiškai aktyvaus pašarų priedo iš augalinės kilmės žaliavos gavimo būdas, kuris apima augalinės žaliavos smulkinimą, bakterijų kultūrų atrinkimą, pasėlio gavimą ir fermentaciją kietame substrate (žiūr. patentą RU2202224). Bakterijų kultūros atrenkamos iš žolėdžių gyvūnų (dažniausiai laukinių) įvairių virškinimo trakto skyrių – pradedant gerklų ertme, prieskrandžiu, žarnynu ir baigiant ekskrementais.

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). Kaip augalinės kilmės žaliavą siūloma panaudoti grūdus – kviečius, miežius, rugius, ryžius, kukurūzus, kvietrugius, avižas; daržoves – bulves, sojas, o taip pat pieno produktus – išrūgas, varškę, liesą pieną. Taip pat siūlomas pašarų sausas (kietas) fermentacijos būdas.

Sausiems fermentuotiems pašarams keliami bendri reikalavimai.

Fermentuotų pašarų gamybai (džiovinimui) rekomenduojamos temperatūros (20-75)°C. Kuo žemesnė temperatūra, tuo išlieka didesnis PRB skaičius. Dažniausiai fermentuotų pašarų drėgnis yra 8-9 %, todėl juose PRB skaičius yra didesnis mažesniame pašaro kiekyje, nes pašaras yra labiau koncentruotas, atitinkamai PRB poveikis gyvūnų sveikatingumui yra reikšmingesnis. PRB sausuose fermentuotuose

turi siekti $10^6 - 10^8$ KSV/g.

Dažniausiai pašarų fermentacijai naudojamos homofermentinės PRB, kurių pagrindinis metabolitas yra pieno rūgštis, o kitų metabolitų (acto rūgšties ir etanolio) produkuojamos koncentracijos nereikšmingos. Jei fermentacijoje dalyvauja heterofermentinės bakterijos, tai pagrindinis metabolizmo produktas gali būti acto rūgštis, o pieno rūgšties išskiriamas kiekis nežymus. PRB, naudojamos pašarų fermentacijai, gali būti homofermentinės ir heterofermentinės. Homofermentinės PRB yra tos, kurių pagrindinis metabolitas pieno rūgštis, o heterofermentinių PRB produkuojamas laktatas toliau metabolizuojamas į acetatą, anglies dvideginį ar kitus metabolitus.

Siekiant užtikrinti fermentuotų pašarų saugą nuo patogeninių mikroorganizmų, taip pat, labai svarbu užtikrinti pakankamai žemą fermentuotų pašarų pH. Rekomenduojamas fermentuotų pašarų pH yra nuo 3,5 iki 5,0.

Taip pat svarbu užtikrinti fermentuotų produktų juslines savybes ir tekstūrą. PRB fermentacijos metu produkuoja pieno rūgštį naudodamos anglies turinčius substratus. Pieno rūgšties koncentracija fermentuotuose produktuose gali skirtis priklausomai nuo terpėje esančių fermentuojamųjų cukrų, PRB rūšies ir kitų faktorių.

Homofermentinėmis PRB bakterijomis fermentuojant substratus pieno rūgšties koncentracija juose dažniausiai kinta nuo 50 iki 300 mM. Heterofermentinėmis PRB fermentuojant gali būti gaunamas, atitinkamai, nuo 50 iki 300 mM acto rūgšties kiekis.

Išradimo esmė

Išradimo tikslas – didelio biologinio aktyvumo augalinės kilmės fermentuotų pašarų gavimas panaudojant naujai atrinktas pieno rūgšties bakterijų padermes išskirtas iš fermentuotos grūdinės žaliavos. Šis tikslas pasiekiamas panaudojant fermentuotų pašarų gamyboje augalinės kilmės substratą ir PRB raugą, kuriame dominuoja *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481 padermės. Toliau bus naudojamas sutrumpintas PRB žymėjimas nenurodant registracijos įstaigos ir registracijos numerių.

Pediococcus acidilactici BaltBio01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 padermės išgautos (izoliuotos) iš Lietuvoje užaugintų varpinių grūdinių kultūrų raugų. Padermių izoliavimo techninius darbus pagal sutartis atliko UAB „Bioseka“. Padermes identifikavo UAB „Biosta“.

Pediococcus acidilactici BaltBio01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 padermių identifikavimas.

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.

BaltBio pieno rūgšties bakterijų išskyrimas iš spontaninių raugų.

10 g raugo maišyta su 90 ml 0,9 % fiziologinio tirpalo (9 g natrio chlorido 1 l distiliuoto vandens, sterilizuota 15 min prie 121°C) homogenizatoriuje Stomacher 400 (Seward medical, London, UK). 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 anaerobinėmis sąlygomis. Po trijų parų nustatytas PRB skaičius 1 g raugo. 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 gliukonatas, 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 prie 121°C. 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 prie 118 °C.

PRB charakterizuotos nustatčius jų morfologiją. Atmetimo būdu atlikus Gram reakcijos ir katalazės testus ir mikroskopinius tyrimus nustatyta, kad 36 PRB padermės buvo gramteigiamos ir buvo rutuliškos formos (kokai). Toliau buvo atlikti angliavandenių fermentacijos ir augimo skirtingose temperatūrose testai. 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 identifikuotos kaip *P. acidilactici*, nes jos nefermentavo maltozės, bet augo 50 °C temperatūroje.

Amplifikacijos PGR metodu buvo identifikuotos 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*.

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.

Toliau aprašyme naudojami terminai, reiškia:

PRB raugas – tai terpėje pagamintoje iš bulvių sulčių, jas autoklavuojant, atvėsinant ir į 30 °C produktą įvedant grynas PRB *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 ir/arba *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 kultūras (į 0,5 litro sulčių/1 ml gryną bakterijų kultūrą, pagausintą MRS buljone).

Substratas – tai bet kokia augalinė žaliava, augalinės kilmės produktai, kuriuose yra angliavandenių, tai gali būti grūdiniai javai ir jų dalys, aliejingos sėklos, ankštiniai augalai, šienas, žolė. Substrato mikrobinei taršai sumažinti ir reikiamo dydžio frakcijai gauti prieš fermentaciją žaliava gali būti smulkinama, apdorojama aukšta temperatūra, garais, ekstruzija bei kitais žinomais būdais.

Fermentacija – paruoštos augalinės kilmės žaliavos fermentacija atliekama 20-40 °C temperatūroje, skystame substrate, kai drėgnis daugiau kaip 50 %, arba kietame substrate, kai drėgnis mažesnis kaip 50 %. Fermentuojama anaerobiniu arba aerobiniu būdu priklausomai nuo substrato savybių – drėgnio, sudėties ir kt. Pradinis PRB raugo kiekis substrate gali būti nuo 0,5% iki 10%. Fermentacijos trukmė nuo 8 h iki 72 h.

Fermentuoto substrato apdorojimas – po fermentacijos fermentuota masė apdorojama įvairiais būdais: smulkinama, sijojama, granuliuojama.

Fermentuoto substrato stabilizavimas – drėgmei sumažinti substratas džiovinamas, sublimuojamas, presuojamas-džiovinamas, gali būti šaldomas, kapsuliuojamas, chemiškai konservuojamas.

Fermentuotas produktas – atsižvelgiant į fermentuoto substrato stabilizavimo būdą gaunamas biologiškai aktyvus pastos, miltelių, granulių pavidalo kietas pašarinės paskirties produktas. Fermentuoto produkto pH nuo 3,0 iki 6,0, jame PRB yra nuo 10^4 iki 10^9 KSV/g. Šiame išradime siūloma toliau aprašyta fermentuotų pašarų gamybos technologija.

1. Substratas – miežinės ir kvietinės sėlenos bei vanduo sumaišomi lėtaeigėje maišyklėje iki homogeninės masės. Maišoma 10 minučių, mišinio temperatūra 29 ± 5 °C, palaikomas drėgnis 50 ± 5 %.

2. Į homogenizuotą substratą įterpiamas iki 10^9 KSV/g pagausintas PRB raugas.

3. Mišinys sumaišomas, ir dedamas į fermentacijos kamerą. Fermentacija vykdoma 24h, prie temperatūros $+30 \pm 2$ °C ir oro drėgnio 85 ± 2 %.

4. Fermentuotas substratas vėl sudedamas į maišyklę ir pagal receptūrą pridedama (0,5 %) pašarinių (gyvulių šėrimo tikslams naudojamų) mielių *Saccharomyces cerevisiae*. Maišoma 10 min.

5. Fermentuotas produktas fasuojamas ir laikomas įprastose sąlygose - temperatūra (15 – 20) °C, oro drėgnis (55-75) %.

Kaip fermentuotų produktų substrato komponentai pasirinkti kviečiai ir miežiai. Atlikus tyrimą su įvairios sudėties substratais buvo pasirinktas optimalios sudėties substratas susidedantis iš 5-20 % kviečių ir 80-95 % miežių sėlenų. Pagaminti iš šios sudėties substrato pašarai be kita ko pasižymi labai geru fermentuotų produktų formavimu presavimo būdu. Toliau pateikiami fermentuoto produkto su šiuo substratu bandymų rezultatai.

Fermentuoto produkto savybės priklauso nuo fermentacijos temperatūros. Fermentuotų kviečių-miežių sėlenų PRB koncentracija (KSV/g) fermentuojant temperatūrose 37 °C ir 20 °C buvo atitinkamai 60×10^8 KSV/g ir 40×10^8 KSV/g.

Džiovinimo fermentuoto produkto PRB KSV priklausomybė nuo džiovinimo temperatūros ir laiko (1 lentelė)

1 lentelė

Džiovinimo temperatūra	PRB KSV/g						
	Laikas, h						
	2	4	6	8	18	20	28
20 °C	450×10^7 – 74×10^8	360×10^7 - 68×10^8	350×10^7 – 66×10^8	320×10^7 - 59×10^8			
30 °C	$>500 \times 10^7$ – 88×10^8	$>500 \times 10^7$ – 150×10^8	$>500 \times 10^7$ – 200×10^8	$>500 \times 10^7$ – 110×10^8	210×10^7 – 20×10^8	180×10^7 – 20×10^8	160×10^6 – 18×10^7

Nustatyta, kad džiovinant išlieka pakankamai didelis kiekis PRB (nepriklausomai nuo džiovinimo trukmės), tačiau 18 ir ilgiau valandų džiovinant 30 °C temperatūroje pradeda augti pelėsiai ir mielės ($(5-6) \times 10^7$ KSV/g) Todėl džiovinimo procesas turi būti kuo trumpesnis.

Džiovinimo fermentuoto produkto pH ir drėgnio priklausomybė nuo džiovinimo laiko (2 lentelė)

2 lentelė

pH		Drėgnis, %	
Laikas, h		Laikas, h	
0	72	0	72
5,50	4,06	45,2-46,6	8,2-9,8
Džiovinimo temperatūra 30 °C			

Fermentuoto produkto priklausomybė nuo išlaikymo laiko.

Išdžiovintas iki rekomenduojamo drėgnio (8,82 %) fermentuotas produktas buvo laikomas kambario temperatūroje polietileninėje pakuotėje. Buvo tiriama taip

laikomo produkto PRB koncentracija (KSV/g) kas 30 parų, t.y., po 0, 30, 60 ir 90 parų (3 lentelė).

3 lentelė

Fermentuotas produktas	Laikymo sąlygos normalios: temperatūra - (15 -30)°C, drėgnis 65 %			
	Paros			
	0	30	60	90
PRB, KSV/g	(16-18)x10 ⁷	(24-20)x10 ⁶	(23,8-20)x10 ⁶	50x10 ⁵

L-(+) ir D-(-) pieno rūgšties izomerų kiekis fermentuotame produkte.

Pediococcus acidilactici BaltBio01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 produkuoja:

D-(-) pieno rūgšties izomerų kiekį 0,111552 mg/100g ir 0,892419 µg/100g atitinkamai;

L (+) pieno rūgšties izomerų kiekį 0,98g/100g ir 0,67 g/100g atitinkamai.

Kviečių-miežių substratas yra tinkamas fermentuotų pašarų gamybai (apie 40 % drėgnio Fermentuotame produkte gaunama PRB koncentracija yra 10⁸ KSV/g). Kviečių-miežių substratas gerai homogenizuojasi, o jį fermentuojant su *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 mišiniu sumažėja mikrobinis žaliavos užterštumas patogeniniais mikroorganizmais – išdžiovintame iki 8,82 % drėgnio produkte (30 °C temperatūroje 28 val.) nenustatyta mielinių ir pelėsinių grybų. PRB koncentracija fermentuotame produkte yra 18×10⁷ KSV/g, kuri po 90 parų laikymo kambario temperatūroje polietileninėje pakuotėje sumažėja iki 50×10⁵ KSV/g. Fermentuotas produktas yra saugus L-(+) ir D-(-) pieno rūgšties izomerų atžvilgiu.

Pediococcus acidilactici BaltBio01 ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 pieno rūgšties bakterijų padermės yra saugios naudoti pašaruose, o su jomis fermentuoti sausi pašarų produktai pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu, nepraranda biologinio aktyvumo saugojant.

Pavyzdžiai:

Pavyzdys 1. Pieno rūgšties bakterijų *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 ir *Pediococcus 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 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 4 lentelėje.

4 lentelė

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 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 perskaiciuotas į 4 proc. riebumo (koreguoto) pieno kiekį, vadovaujantis koeficientais. Pieno mėginiai buvo paimti iš kiekvienos karvės individualiai pagal pieno mėginių ėmimo taisyklės (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,	17,22	16,94	17,83	19,17	19,88	23,43

kg/d						
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 ($p > 0,05$).

Remiantis gautais rezultatais, konstatuota, kad šeriant melžiamas karves fermentuotu pašaru (60 % drėgnio 90 g/per parą), kuriame *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 kiekis ne mažesnis nei $5,0 \times 10^8$ KSV/g esant šėrimo trukmei ne trumpesnei nei 56 dienos, padidėjo melžiamų karvių produktyvumas.

Išradimo apibrėžtis

1. Augalinės kilmės fermentuoti pašarai susidedantys pieno rūgšties bakterijų raugo ir substrato, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad raugo sudėtyje dominuoja padermės *Pediococcus acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 ar/ir *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02 MSCL P1481, ir naudojamas substratas – augalinės kilmės produktai turintys angliavandenių – grūdiniai javai ir jų dalys, aliejingos sėklos, ankštiniai augalai, šienas, žolė.

2. Fermentuoti pašarai, pagal 1 punktą, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad substratas yra mišinys susidedantis iš 5-20 % kviečių sėlenų ir 80-95 % miežių sėlenų.

3. Fermentuoti pašarai, pagal 1 punktą, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad pieno rūgšties bakterijų raugo ir substrato santykis fermentacijos pradžioje turi būti 0,5-10 dalių su 90-99,5 dalių atitinkamai, geriausia 2:98.

4. Fermentuoti pašarai, pagal 1-3 punktus, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad substratas su pieno rūgšties bakterijų raugu fermentuojamas temperatūrų intervale 30-34 °C iki pasiekama pieno rūgšties bakterijų koncentracija 10^8 - 10^9 KSV/g.

5. Fermentuoti pašarai, pagal 1-4 punktus, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad substratas prieš fermentaciją ekstruduotas ir esant mažiau nei 50 % drėgmei fermentuotas 30 °C arba mažesnėje temperatūroje.

6. Fermentuoti pašarai, pagal 1-5 punktus, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad po fermentacijos gautas fermentuotas produktas presavimo būdu granuluotas ir išdžiovintas iki 8-10 % drėgnio.

7. Fermentuoti pašarai, pagal 1-6 punktus, **b e s i s k i r i a n t y s** tuo, kad jie skirti atrajojančių gyvulių šėrimui.