



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2012141979/13**, **03.10.2012**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **03.10.2012**(45) Опубликовано: **20.02.2014** Бюл. № 5(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2412612 C1**, **27.02.2011**. **RU 2280464 C2**, **27.07.2006**. **RU 2433738 C1**, **20.11.2011**.

Адрес для переписки:

**121433, Москва, ул. Малая Филевская, 58,
кв.12, Н.А. Ушаковой**

(72) Автор(ы):

**Ушакова Нина Александровна (RU),
Павлов Дмитрий Сергеевич (RU),
Правдин Валерий Геннадьевич (RU),
Кравцова Любовь Захарьевна (RU),
Пономарев Сергей Владимирович (RU),
Ратникова Ирина Александровна (KZ),
Гаврилова Нина Николаевна (KZ)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт проблем
экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук (RU),
Общество с ограниченной
ответственностью "Научно-технический
центр биологических технологий в сельском
хозяйстве" (RU)****(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСНОЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

(57) Реферат:

Способ предусматривает получение жидких культур *Cellulomonas uda* ATCC 491, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 путем их раздельного глубинного культивирования на питательных средах заданного состава. Полученные культуры смешивают, проводят твердофазную ферментацию в условиях ограниченного доступа кислорода и высушивают до влажности 8-10%. В качестве носителя для твердофазной ферментации

используют свекловичный жом, обработанный целлюлолитическим ферментом и обогащенный ферментализатом кормовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В высушенный продукт добавляют сухие порошки травы эхинацеи пурпурной и плодов расторопши пятнистой. Полученную смесь перемешивают и подвергают дроблению до получения однородного продукта. Изобретение обеспечивает получение биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб. 1 з.п. ф-лы, 2 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2012141979/13, 03.10.2012**(24) Effective date for property rights:
03.10.2012

Priority:

(22) Date of filing: **03.10.2012**(45) Date of publication: **20.02.2014 Bull. 5**

Mail address:

**121433, Moskva, ul. Malaja Filevskaja, 58, kv.12,
N.A. Ushakovoj**

(72) Inventor(s):

**Ushakova Nina Aleksandrovna (RU),
Pavlov Dmitrij Sergeevich (RU),
Pravdin Valerij Gennad'evich (RU),
Kravtsova Ljubov' Zakhar'evna (RU),
Ponomarev Sergej Vladimirovich (RU),
Ratnikova Irina Aleksandrovna (KZ),
Gavrilova Nina Nikolaevna (KZ)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut problem ehkologii i
ehvoljutsii im. A.N. Severtsova Rossijskoj
akademii nauk (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Nauchno-tehnicheskij tsentr biologicheskikh
tekhnologij v sel'skom khozjajstve" (RU)**

(54) METHOD FOR PRODUCTION OF COMPLEX BIOLOGICALLY ACTIVE FODDER ADDITIVE FOR STURGEON FISHES

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: method envisages production of liquid cultures *Cellulomonas uda* ATSS 491, *Bacillus subtilis* All-Russian collection of industrial microorganisms B-8130, *Bacillus subtilis* All-Russian collection of industrial microorganisms B-2984, *Bacillus subtilis* All-Russian collection of industrial microorganisms B-4099 and *Bacillus licheniformis* All-Russian collection of industrial microorganisms B-4162 by way of their separate in-depth cultivation in nutrient media of a specified composition. The produced cultures are mixed,

subjected to solid phase fermentation under restricted oxygen access conditions and dried till moisture content is equal to 8-10%. The carrier for solid phase fermentation is represented by beet-root pulp treated with a cellulolytic enzyme and enriched with fermentolysate of *Saccharomyces cerevisiae* fodder yeast. Dry powders of purple echinacea herb and Saint-Mary-thistle fruits are added into the dried product. The produced mixture is mixed and crushed till a homogenous product production.

EFFECT: invention ensures production of a biologically active fodder additive for sturgeon fishes.

2 cl, 2 tbl, 1 ex

Изобретение относится к кормопроизводству, в частности к способам приготовления биологически активных пробиотических добавок кормового назначения для рыбы, повышающих эффективность пищеварения, оказывающих разностороннее действие на организм, и позволяющих применять их как для

повышения сохранности стада рыб, так и для стимуляции роста и повышения продуктивности.

Для получения новых биологически активных препаратов используют различные виды пробиотических бактерий - продуцентов биологически активных веществ, комбинируют комплексы пробиотиков с фитобиотиками.

Для пробиотических препаратов важна устойчивость клеток к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, поэтому получение биопленки пробиотиков способствует защите вегетативных клеток при высушивании, грануляции, а также в кислых условиях желудка.

Известны способы применения пробиотических препаратов на основе бацилл рода *Bacillus* для рыб, в том числе *B. subtilis* ВКПМ В-8130 с получением жидкой культуры и последующей твердофазной ферментации растительного сырья при затрудненном доступе кислорода. В качестве растительного сырья используют облепиховый, шиповниковый, подсолнечниковый шрот или жмых, отходы мукомольного производства, производства круп (RU 2346463 С2, 20.02.2009).

Ранее было также показано, что представители рода *Cellulomonas* могут входить в состав пробиотического препарата для животных, что явилось основанием для комбинирования бацилл с целлюломонасом. Известная кормовая добавка бентобак, представляет собой ассоциацию из целлюлозолитических бактерий *Cellulomonas flavigena* - 22a и пропионовокислых бактерий *P.shermanii* - 15, адсорбированных на бентоните, и предназначена для нормализации белкового обмена, повышения продуктивности животных. Препарат приводит к приросту живой массы сельскохозяйственных животных на 30%, уменьшению затрат корма на 5% (Гаврилова Н.Н. Создание и производство новых пробиотиков на основе бактериальных культур. Автореферат дисс.на соис.уч. ст.д.б.н. С-П, 1993).

Известно использование растительных экстрактов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) и экстракта корней и травы эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) в составе биологически активного средства, заключенного в оболочку из фосфолипидов, предназначенного для профилактики колибактериоза птиц. Средство в виде водорастворимой формы применения добавляют к корму, что позволяет повысить сопротивляемость организма птицы инфекционным заболеваниям (RU 2355410 С2, 20.05.2008).

Наиболее близким по технической сущности к предложенному способу является способ получения пробиотической кормовой добавки Ферм КМ, которую получают глубинным культивированием штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В -2984, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 и последующим твердофазным ферментированием. Для чего полученные жидкие культуры *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В -2984 и *Bacillus* ВКПМ В-4099 смешивают в соотношении 6:6:1 до объема 65 л, наносят на 200 кг стерильного свекловичного жома, который предварительно обрабатывают целлюлолитическим ферментом, растворенным в питательной среде, содержащей на 30 л воды: мелассу - 255-265 г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 98-102 г, магний сернокислый-25-26 г, дрожжи -1,8-2,2 г, доводят рН до 6,0-6,5 и выдерживают 2 ч при температуре 45-50°C. После предобработки свекловичного жома к нему

добавляют смесь культуральных жидкостей *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984 по 30 л на загрузку, и *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099 - 5 л на загрузку, доводят pH до 7,5-8,0 и влажность замеса до 43-48%. Смесь тщательно перемешивают и проводят твердофазную ферментацию в условиях ограниченного доступа кислорода в течение 48 ч при температуре 45-50°C, после чего высушивают при температуре 50°C до влажности 8-10%. При этом жидкую культуру *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 непосредственно смешивают со свекловичным жомом и высушивают до влажности 8-9%, полученные высушенные продукты перемешивают в течение 0,5 ч и подвергают дроблению до получения однородного продукта. RU 2412612 С1, 27.02.2011. Применяется пробиотическая кормовая добавка Ферм КМ в рационах сельскохозяйственных животных и птиц, что обеспечивает их более интенсивный рост и развитие, увеличивает конверсию корма на 10% и повышает сохранность поголовья.

Технической задачей предлагаемого изобретения является разработка способа получения комплексной биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб, в котором заявленная комбинация пробиотических бактерий оказалась удачной при использовании в комбикормах осетровых рыб. У молоди осетровых на рационе с использованием кормовой добавки существенно увеличивается коэффициент упитанности, абсолютный и среднесуточный приросты, коэффициент массонакопления.

Технический результат изобретения, получаемый при реализации разработанного способа, заключается в обеспечении широкого спектра биологического действия комплексной биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб, включающего профилактическую эффективность добавки за счет нормализации кишечной микробиоты, стимуляции иммунитета, повышения защиты печени, со стимуляцией пищеварения протеина -основного компонента кормов для осетровых.

Существенной отличительной особенностью заявленного способа является введение в пробиотическую ассоциацию культур рода *Bacillus* штамма целлюлолитических бактерий *Cellulomonas uda* ATCC 491, продуцирующего лизин, глутаминовую кислоту и обладающего целлюлазой, проведение твердофазного культивирования полученной ассоциации бактерий на фитосубстрате, в результате которого образуется биопленка пробиотиков на твердом носителе, которая повышает жизнеспособность бактерий, и их активность в кишечном тракте. В препарате сохраняются образующиеся бактериальные метаболиты, которые во многом определяют эффективность комплексной биологически активной кормовой добавки. Биопленка пробиотиков способствует защите вегетативных клеток в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Преимуществом новой комплексной биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб является совмещение свойств пробиотического препарата, нормализующего кишечную микробиоту, со стимуляцией пищеварения протеина -основного компонента кормов для осетровых.

Технический результат достигается с помощью способа получения комплексной биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб, предусматривающий приготовление жидкой культуры *Cellulomonas uda* ATCC 491 глубинным способом культивирования при аэрации на питательной среде, содержащей, г/л:

меласса	24-26
глютен кукурузный	14-16
кукурузный экстракт	19-21

калий фосфорнокислый двузамещенный	1-3
натрий хлористый	9-11
магний сернокислый	0,4-0,6
вода	остальное

5 Полученную жидкую культуру *Cellulomonas uda* ATCC 491 в количестве 50 л смешивают с жидкими культурами, полученными при отдельном глубинном культивировании штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162

10 (бактериальной составляющей пробиотической кормовой добавки Ферм КМ), взятыми в соотношении, соответственно, 18 л-18 л-4 л-10 л на одну загрузку. Общую смесь жидких культур в количестве 100 л наносят на предварительно подготовленный носитель для проведения твердофазной ферментации - стерильный свекловичный жом

15 в количестве 200 кг, обработанный целлюлолитическим ферментом и обогащенный ферментоллизатом кормовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для получения ферментолизата готовят: мелассу - 255-265 г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 98-102 г, магний сернокислый - 25-26 г, кормовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - 3 кг и воду до 30 л. Смесь стерилизуют при

20 температуре 120°C в течение 30 мин и добавляют к носителю, в который вносят 4 л раствора целлюлолитического фермента (целловиридина или целлюлокса F или др.) с содержанием целлюлазы не менее 2000 ед/г носителя, доводят pH до 6,0-6,5, смесь перемешивают, выдерживают 2 ч при температуре 45-50°C. Твердофазную ферментацию проводят в условиях ограниченного доступа кислорода при

25 температуре 40-45°C, pH 7,5-8,0 и влажности замеса 43-48% в течение 48-50 ч и затем высушивают до влажности 8-10%, после чего добавляют сухие порошки травы эхинацеи пурпурной и плодов расторопши пятнистой из расчета 20-50 г порошка эхинацеи и 20-50 г порошка расторопши на 1 кг конечного продукта. Полученную

30 смесь перемешивают и подвергают дроблению до получения однородной массы. Полученной комплексной кормовой добавке - модифицированной форме препарата Ферм-КМ присвоено наименование «Ферм-КМ** с *Cellulomonas uda* ATCC 491».

Кормовую добавку как препарат вводят в рацион осетровых в количестве 2,0 кг/т комбикорма.

35 Изобретение поясняется следующим примером.

Пример. Проводят отдельное глубинное культивирование штаммов *Cellulomonas uda* ATCC 491, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130 и *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984 на питательной среде, содержащей, г/л:

40	меласса	24-26
	глютен кукурузный	14-16
	кукурузный экстракт	19-21
	калий фосфорнокислый двузамещенный	1-3
	натрий хлористый	9-11
45	магний сернокислый	0,4-0,6
	вода	остальное

Культивирование штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099 ведут на питательной среде, содержащей, г/л:

50	меласса	14-16
	глютен кукурузный	9-11
	кукурузный экстракт	9-11

аммоний фосфорнокислый двузамещенный	1-3
натрий хлористый	9-12
магний сернокислый	0,4-0,6
вода	остальное,

а штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 - на питательной среде, содержащей, г/л:

меласса	24-26
кукурузный экстракт	18-22
калий фосфорнокислый двузамещенный	1-3
натрий хлористый	9-11
магний сернокислый	0,4-0,6
вода	остальное

Полученную жидкую культуру *Cellulomonas uda* ATCC 491 в количестве 50 л смешивают с жидкими культурами, полученными при отдельном глубинном культивировании штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 (бактериальной составляющей пробиотической кормовой добавки Ферм КМ), взятыми в соотношении, соответственно, 18 л - 18 л - 4 л - 10 л на одну загрузку. К полученной смеси добавляют жидкую культуру в количестве 10 л. Общую смесь жидких культур в количестве 100 л наносят на предварительно подготовленный носитель для проведения твердофазной ферментации - стерильный свекловичный жом в количестве 200 кг, обработанный целлюлолитическим ферментом и обогащенный ферментоллизатом кормовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для получения ферментолизата готовят: мелассу - 260 г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 102 г, магний сернокислый - 26 г, кормовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - 3 кг и воду до 30 л. Смесь стерилизуют при температуре 120°C в течение 30 мин и добавляют к носителю, в который вносят 4 л раствора целловиридина с содержанием целлюлазы не менее 2000 ед/г носителя, доводят рН до 6,5, смесь перемешивают, выдерживают 2 ч при температуре 48°C. Твердофазное культивирование проводят в условиях ограниченного доступа кислорода при температуре 45°C, рН 7,8 и влажности замеса 47% в течение 50 ч и затем высушивают до влажности 8-10%, после чего добавляют сухие порошки травы эхинацеи пурпурной и плодов расторопши пятнистой из расчета 45 г порошка эхинацеи и 30 г порошка расторопши на 1 кг конечного продукта. Полученную смесь перемешивают и подвергают дроблению до получения однородной массы с крупностью, соответствующей требованиям продукции комбикормовой промышленности

Проведен опыт на молоди осетровых рыб. В качестве объекта исследований использовали двухлетков гибрида русско-ленского осетра. Выращивание осетровых рыб осуществляли в стеклопластиковых бассейнах с закругленными углами объемом 0,8 м³ с постоянной проточностью при плотности посадки 15 экз. на бассейн.

Сухую форму комплексной биологически активной кормовой добавки Ферм-КМ** с *Cellulomonas uda* ATCC 491 вводили в состав комбикормов в процессе изготовления. Норма введения добавки составляла 2 г на 1 кг продукционного комбикорма. Состав кормов приведен в таблице 1.

Таблица 1

Состав опытных рецептов продукционного комбикорма ОТ-7 для осетровых рыб

Ингредиенты, %	Варианты	
	контроль	опыт
Мука рыбная	50	50
Соевый шрот	13	13
Кукурузный глютен	10	10
Гороховый протеин	20	20
Рыбий жир	6,0	6,0
Премикс	1,0	1,0
Ферм-КМ** с Cellulomonas uda ATCC 491	-	0,2
Протеин	49,0	49,0
Жир	10,0	10,0
Углеводы	21,7	21,7
Минеральные вещества	10,0	10,0
Влага	8,5	8,5
Клетчатка	0,8	0,8

Лучшие рыбоводно-биологические показатели по результатам выращивания показала опытная группа рыб, потреблявшая комбикорм с добавлением кормовой добавки Ферм-КМ** с *Cellulomonas uda* ATCC 491. За 31 сутки абсолютный прирост в этой группе составил 60,4 г, что на 18,5 г выше, чем в контроле. Весовой рост при кормлении двухлеток гибрида кормом с Ферм-КМ** с *Cellulomonas uda* ATCC 491 шел интенсивнее, чем в контрольном варианте, что отразилось также на показателе упитанности. Так, коэффициент упитанности составил 0,39%, а в контроле - 0,35% (табл.2).

Показатели среднесуточного прироста и среднесуточной скорости роста также были выше у рыб из опытной группы и составили 1,95 г и 0,72% соответственно. В то время как в контрольной группе они были ниже на 0,63 г и 0,22%.

Рыбоводно-биологические показатели выращивания двухлетков гибрида осетровых рыб		
Показатели	Варианты опыта	
	контроль	опыт с Ферм-КМ** с Cellulomonas uda ATCC 491
1	2	3
Масса, г: начальная	250,6±19,17	243,8±20,86
конечная	292,5±22,4	304,2±31,2
Длина, см: начальная	42,65±0,88	41,52±1,22
конечная	43,8±1,08	42,6±1,17
Коэффициент упитанности по Фультону, %	0,35	0,39
Абсолютный прирост, г	41,9	60,4
Среднесуточный прирост, г	1,32	1,95
Среднесуточная скорость роста, %	0,5	0,72
Коэффициент массонакопления, ед	0,031	0,045
Кормовой коэффициент	1,2	1,0
Выживаемость, %	100	100

Кормовой коэффициент, который характеризует конверсию корма, в опытном варианте был на 0,2 единицы ниже контрольного.

Формула изобретения

1. Способ получения комплексной биологически активной кормовой добавки для осетровых рыб, заключающийся в том, что осуществляют раздельное глубинное культивирование штаммов *Cellulomonas uda* ATCC 491, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130 и *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984 на питательной среде, содержащей, г/л:

5	меласса	24-26
	глутен кукурузный	14-16
	кукурузный экстракт	19-21
	калий фосфорнокислый двузамещенный	1-3
	натрий хлористый	9-11
	магний сернокислый	0,4-0,6
	вода	остальное,

штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099 на питательной среде, содержащей, г/л:

15	меласса	14-16
	глутен кукурузный	9-11
	кукурузный экстракт	9-11
	аммоний фосфорнокислый двузамещенный	1-3
	натрий хлористый	9-12
	магний сернокислый	0,4-0,6
	вода	остальное,

и штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4162 на питательной среде, содержащей, г/л:

25	меласса	24-26
	кукурузный экстракт	18-22
	калий фосфорнокислый двузамещенный	1-3
	натрий хлористый	9-11
	магний сернокислый	0,4-0,6
	вода	остальное,

полученную жидкую культуру *Cellulomonas uda* ATCC 491 смешивают с жидкими культурами *Bacillus subtilis* ВКПМ В-8130, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4099, взятыми в соотношении 18:18:4:10 соответственно, и полученную смесь наносят на предварительно подготовленный носитель для проведения твердофазной ферментации - стерильный свекловичный жом, обработанный целлюлолитическим ферментом, и обогащенный ферментализатом кормовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, смесь тщательно перемешивают и проводят твердофазную ферментацию в условиях ограниченного доступа кислорода при температуре 45-50°C, pH 7,5-8,0 и влажности замеса 43-48% в течение 48-50 ч с последующим высушиванием до влажности 8-10%, после чего добавляют сухие порошки травы эхинацеи пурпурной и плодов расторопши пятнистой из расчета по 20-50 г соответственно на 1 кг конечного продукта, полученную смесь подвергают дроблению до получения однородного продукта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что ферментализат получают на среде, содержащей: мелассу 255-265 г, калий фосфорнокислый двузамещенный 98-102 г, магний сернокислый 25-26 г, кормовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 3 кг и воду до 30 л.