



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A23K 10/00 (2025.08); A23K 10/16 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025103647, 18.02.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2025

Дата регистрации:
12.11.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.02.2025

(45) Опубликовано: 12.11.2025 Бюл. № 32

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Крылова Анна Сергеевна

(72) Автор(ы):

Шайдорова Галина Михайловна (RU),
Круть Ульяна Александровна (RU),
Иванова Софья Михайловна (RU),
Селезнев Александр Олегович (RU),
Ляховченко Никита Сергеевич (RU),
Потапова Марина Сергеевна (RU),
Перепелица Мария Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2782383 C1, 26.10.2022. RU
2552872 C1, 10.06.2015. RU 2433738 C1,
20.11.2011. CN 105309777 A, 10.02.2016.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ

(57) Реферат:

Способ получения кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птиц относится к кормовой промышленности. Способ включает смешивание пробиотического компонента и сорбента в массовом соотношении 5:1. В качестве пробиотического компонента используют штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ 10^6 , который получают, используя питательную среду следующего состава, мас. %: сухая молочная сыворотка 1,5, хлорид натрия 0,03, дигидрофосфат калия 0,03, карбонат натрия 0,03 и сульфат железа 7-водный 0,003, вода дистиллированная свежеприготовленная - остальное, или штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ 10^9 , который получают, используя питательную среду следующего состава, масс. %: сухая молочная сыворотка 3,

хлорид натрия 0,06, дигидрофосфат калия 0,06, карбонат натрия 0,06 и сульфат железа 7-водный 0,006, вода дистиллированная свежеприготовленная - остальное. В качестве сорбента используют пасту, полученную путем смешения измельченного стерильного бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, с водным раствором Трилона Б в массовом соотношении 1:1, причем раствор Трилона Б готовят из расчета 0,25 мг на литр дистиллированной воды. Сорбент в виде пасты добавляют к пробиотическому компоненту с биомассой КОЕ 10^6 - 10^9 по частям, тщательно перемешивая после каждого добавления и при необходимости смачивая физиологическим раствором до получения биокomпозиции в виде однородной кашеобразной

смеси влажностью 40%, после чего емкость с полученной биокомпозицией ставят в орбитальный шейкер, где перемешивают ее при скорости 100 об/мин при температуре 36°C в течение 24 ч. Перед лиофильной сушкой осуществляют предварительное замораживание при минус 40°C в течение 24 ч, а после основной сушки при минус 50°C в течение 24 ч, проводят

остаточное высушивание при минус 20°C до достижения конечной влажности не более 5%. Способ обеспечивает получение кормовой добавки с высокой эффективностью нейтрализации микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных и птиц, а с увеличенной сорбционной способностью кормовой добавки. 3 пр., 2 табл.

R U 2 8 5 0 6 6 0 C 1

R U 2 8 5 0 6 6 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A23K 10/00 (2025.08); A23K 10/16 (2025.08)(21)(22) Application: **2025103647, 18.02.2025**(24) Effective date for property rights:
18.02.2025Registration date:
12.11.2025

Priority:

(22) Date of filing: **18.02.2025**(45) Date of publication: **12.11.2025 Bull. № 32**

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Krylova Anna Sergeevna**

(72) Inventor(s):

**Shaيدorova Galina Mikhailovna (RU),
Krut Uliana Aleksandrovna (RU),
Ivanova Sofia Mikhailovna (RU),
Seleznev Aleksandr Olegovich (RU),
Liakhovchenko Nikita Sergeevich (RU),
Potapova Marina Sergeevna (RU),
Perepelitsa Mariia Mikhailovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD OF OBTAINING FEED ADDITIVES FOR FARM ANIMALS AND POULTRY**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: method for producing a feed additive for farm animals and poultry relates to the feed industry. The method involves mixing a probiotic component and a sorbent in a mass ratio of 5:1. The probiotic component used is the *Bacillus subtilis* strain BKM B3728D with a biomass of 10^6 , which is obtained using a nutrient medium with the following composition, wt. %: dry milk whey 1.5, sodium chloride 0.03, potassium dihydrogen phosphate 0.03, sodium carbonate 0.03 and iron sulphate heptahydrate 0.003, freshly prepared distilled water - the rest, or the *Bacillus subtilis* VKM B3728D strain with a biomass of 10^9 CFU, which is obtained using a nutrient medium with the following composition, mas. %: dry milk whey 3, sodium chloride 0.06, potassium dihydrogen phosphate 0.06, sodium carbonate 0.06 and iron sulphate heptahydrate 0.006, freshly prepared distilled water - the rest. A paste obtained by mixing crushed sterile bentonite material containing sodium montmorillonite with an aqueous solution of Trilon B in a mass ratio of 1:1 is used as a

sorbent, wherein the Trilon B solution is prepared at a rate of 0.25 mg per litre of distilled water. The sorbent in the form of a paste is added to the probiotic component with biomass COE 10^6 - 10^9 in parts, thoroughly mixing after each addition and, if necessary, moistening with saline solution until a biocomposition is obtained in the form of a homogeneous porridge-like mixture with a moisture content of 40%, after which the container with the resulting biocomposition is placed in an orbital shaker, where it is mixed at a speed of 100 rpm at a temperature of 36°C for 24 hours. Before freeze-drying, pre-freezing is carried out at minus 40°C for 24 hours, and after the main drying at minus 50°C for 24 hours, residual drying is carried out at minus 20°C until the final moisture content of no more than 5% is reached.

EFFECT: obtaining a feed additive with high efficiency in neutralising mycotoxins in feed for farm animals and poultry, and with increased sorption capacity of the feed additive.

1 cl, 3 ex, 2 tbl

Изобретение относится к кормовой промышленности и направлено на получение кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птиц. Известно, что сочетание пробиотиков и пребиотиков, обеспечивает синбиотический эффект, который усиливает действие каждого компонента, что обеспечивает дополнительную питательную среду для роста и активности полезных бактерий, что позволяет широко использовать их в качестве биологически активных добавок и компонентов функционального питания. В составе таких препаратов могут присутствовать различные штаммы бактерий, например, представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также дополнительные биологически активные вещества, такие как фруктоолигосахариды, пектины и аминокислоты.

В настоящее время наблюдается значительный интерес к разработке синбиотических кормовых добавок для сельскохозяйственных птиц и животных, способных обеспечить комплексное улучшение пищеварения, нормализацию работы кишечника, купирование воспалительных процессов и укрепление иммунитета. Такие добавки особенно актуальны при использовании кормов низкого качества, часто загрязненных микотоксинами, что приводит к снижению продуктивности животных и значительным экономическим потерям.

Известен способ профилактики микотоксикозов и желудочно-кишечных заболеваний животных (патент RU № 2491942, опубл. 10.09.2013), в котором описывается способ профилактики микотоксикозов и желудочно-кишечных заболеваний у животных через введение микробного препарата на основе штамма *Bacillus subtilis*-93. Препарат вводится в дозировке 6-10 мл (с содержанием 1 млрд клеток/мл) в течение 10 дней, что способствует снижению заболеваемости и улучшению состояния ЖКТ. Штамм *B. subtilis*-93 получают путем размножения в питательных средах, принятых в производстве пробиотических препаратов.

Недостаток: отсутствие в добавке адсорбентов микотоксинов снижает эффективность способа при высоком уровне загрязнения кормов, так как пробиотическое действие штамма не обеспечивает прямой нейтрализации токсинов.

Также известен способ применения кормовой добавки "красная глина" для профилактики микотоксикозов у сельскохозяйственной птицы (патент RU №2731893, опубл. 09.09.2020). Изобретение предлагает способ применения кормовой добавки на основе природного минерала «красная глина». Добавка вводится в количестве 3-5% от массы корма по циклической схеме (10 дней с добавкой, затем 10 дней без нее). «Красная глина» действует как адсорбент, снижая биодоступность микотоксинов.

Кормовая добавка «красная глина» - минеральный продукт, полученный из отходов производства кирпича из обожженной глины (код ФККО:34321000000), Агачаульского месторождения, Республики Дагестан.

Недостаток: способ не обеспечивает получения дополнительного пробиотического или иммуномодулирующего эффекта, поскольку минеральный продукт, полученный из отходов производства кирпича из обожженной глины, сам по себе не способствует восстановлению и поддержанию нормальной микрофлоры кишечника.

Известен способ получения средства для профилактики и лечения микотоксикозов у сельскохозяйственной птицы (патент RU №2207122, опубл. 27.06.2003), заключающийся в размалывании и перемешивании активного угля и таких неорганических солей, как селенит натрия, сульфаты меди и магния, хлорид кобальта, бикарбонат натрия. Комплексное действие достигается за счет адсорбционных свойств активированного угля и биологически активного влияния неорганических компонентов.

Недостаток: возможность накопления тяжелых металлов при длительном применении

или превышении дозировки средства, полученного по описанному способу, что может привести к токсическим эффектам.

Общий недостаток вышеуказанных технических решений заключается в том, что известные способы не обеспечивают получения комплексного состава, позволяющего сочетать пробиотические и сорбционные свойства добавок.

В этой связи возникает необходимость в разработке нового решения, объединяющего пробиотический эффект с адсорбционными свойствами, что позволит эффективно нейтрализовать микотоксины в корме и одновременно поддерживать здоровую кишечную микрофлору благодаря сорбционным свойствам.

Прототипом данного изобретения является способ получения сорбционной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птицы (патент RU 2782383 C1, опубл. 26.10.2022), заключающийся в смешивании пробиотического компонента и сорбента при комнатной температуре и постоянном механическом перемешивании в течение не менее 40 минут. В качестве пробиотического компонента используют живую массу микроорганизмов *Bacillus subtilis* в количестве 70-85 мас.%, а остальное - сорбент. В качестве сорбента используют монтмориллонит содержащую глину, которую предварительно выдерживают 1,5 часа при 180°C. Затем смесь замораживают при минус 80°C и подвергают лиофильной сушке при минус 50°C до достижения влажности 3-5%.

Недостаток: неравномерное распределение бактерий по поверхности глины и, следовательно, низкая эффективность биотрансформации микотоксинов, что обусловлено образованием комков монтмориллонитовой глины при перемешивании за счет её плохой смачиваемости.

Задача изобретения - изобретение направлено на расширение арсенала способов получения кормовой добавки, обеспечивающей профилактику микотоксикозов у сельскохозяйственных животных и птицы.

Технический результат - достижение поставленной задачи за счет создания способа получения добавки с высокой эффективностью нейтрализации микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных и птиц, а также за счет увеличения сорбционной способности кормовой добавки. Пробиотический компонент штамм *Bacillus subtilis* как пробиотик улучшает состав кишечной микрофлоры и способствует поддержанию здоровья ЖКТ. Адсорбент в составе продукта эффективно адсорбирует микотоксины, снижая их токсическое воздействие на организм. Это позволяет минимизировать негативное влияние микотоксинов, которые могут нарушать работу кишечника и подавлять активность полезных микроорганизмов. Следовательно, обеспечивает синергетический эффект, заключающийся в том, что подавление микотоксинов создает более благоприятную среду для жизнедеятельности и активности *Bacillus subtilis*. Таким образом, эффект от сочетания пробиотика и сорбента в отношении адсорбции микотоксинов превышает сумму их индивидуальных действий. Тем самым подавление микотоксинов адсорбентом улучшает условия для работы пробиотика, достигается синергетический эффект, соответствующий определению симбиотического продукта, в котором компоненты взаимодействуют для усиления пользы для здоровья.

Заявленный способ получения симбиотической кормовой добавки включает смешивание пробиотического компонента и сорбента при комнатной температуре, лиофильную сушку при минус 50°C до достижения влажности не выше 5%, в который внесены следующие новые признаки:

- в качестве пробиотического компонента используют штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ 10^6 - 10^9 ;
- в качестве сорбента используют пасту, полученную путем смешения измельченного

стерильного бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, с водным раствором Трилона Б по массовому соотношению 1:1, причем раствор Трилона Б готовят из расчета 0,25 мг на литр дистиллированной воды;

- к пробиотическому компоненту с биомассой КОЕ $10^6 - 10^9$ добавляют по частям сорбент в виде пасты в массовом соотношении 5:1, тщательно перемешивая после каждого добавления со скоростью 50 об/мин,

не давая образоваться пене, и при необходимости смачивая физиологическим раствором до получения биоконпозиции в виде однородной кашеобразной смеси влажностью 40%;

- перед лиофильной сушкой осуществляют предварительное замораживание при минус 40°C в течение 24 ч, а после основной сушки при минус 50°C в течение 24 ч, проводят остаточное высушивание при минус 20°C до достижения конечной влажности не более 5%;

- пробиотический штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ $10^6 - 10^9$ получают используя питательную среду следующего состава, мас. %: сухая молочная сыворотка 1,5-3, хлорид натрия 0,03-0,06, дигидрофосфат калия 0,03-0,06, карбонат натрия 0,03-0,06 и сульфат железа 7-водный 0,003-0,006, вода дистиллированная свежеприготовленная остальное.

Особенностью данного состава является использование Трилона Б, который действует как эмульгатор и стабилизатор биоконпозиции. Благодаря этому веществу бентонитовый материал, содержащий натриевую форму монтмориллонита, становится лучше смачиваемым, что предотвращает образование комков. В результате увеличивается площадь соприкосновения между компонентами биоконпозиции и клетки штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3701D равномерно распределяются по бентонитовому материалу, содержащему натриевую форму монтмориллонита. Кроме того, Трилон Б широко используется в пищевой промышленности как консервант и добавка Е385 при производстве консервов, что гарантирует его безопасность для сельскохозяйственных животных и птиц.

Также отличительной особенностью является использование штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, а также то, что в качестве питательной среды для получения пробиотического штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ $10^6 - 10^9$ используется следующий состав, мас. %: пробиотический штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ $10^6 - 10^9$ получают, используя питательную среду следующего состава, мас. %: сухая молочная сыворотка 1,5 - 3, хлорид натрия 0,03-0,06, дигидрофосфат калия 0,03-0,06, карбонат натрия 0,03-0,06 и сульфат железа 7-водный 0,003-0,006, вода дистиллированная свежеприготовленная остальное.

Такой состав обеспечивает оптимальные условия для быстрого роста бактерий и накопления биомассы.

Способ получения симбиотической кормовой добавки для животных осуществляют следующим образом:

Начинают процесс с подготовки культуры бактерий. Используют 12-часовую культуру *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, выращенную на среде LB, содержащей 1,5% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% хлорида натрия, разбавленных дистиллированной водой. Полученную культуру вносят в ферментер, в котором находится питательная среда, содержащая мас. %: сухой молочной сыворотки - 1,5-3, хлорида натрия - 0,03-0,06, дигидрофосфата калия - 0,03-0,06, карбоната натрия - 0,03-0,06, сульфата железа 7-водного - 0,003-0,006 и дистиллированной воды - остальное.

Процесс ведут до момента, когда будет накоплена биомасса бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D 10^6 - 10^9 КОЕ.

Переходят ко второму этапу - подготовке сорбента. Стерильный бентонитовый материал, содержащий монтмориллонит натриевой формы, перемешивают с раствором, содержащим 0,25 мг трилона Б на литр воды, в массовом соотношении 1:1. Суспензию перемешивают до получения пастообразного состояния, что предотвращает образование сухих комков и обеспечивает стабильное распределение минеральных частиц монтмориллонита.

На третьем этапе, когда в жидкой питательной среде накоплена биомасса бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D 10^6 - 10^9 колониеобразующих единиц, в неё добавляют пасту с стерильным бентонитовым материалом, содержащим натриевую форму монтмориллонита, и Трилоном Б, в массовом соотношении биомасса:паста - 5:1. Далее полученную биокомпозицию тщательно перемешивают со скоростью 50 об/мин до однородной массы, уделяя особое внимание отсутствию образования пены. Если влажность биокомпозиции оказывается ниже 40%, ее увлажняют физиологическим раствором до достижения однородной, кашеобразной консистенции.

Затем следует этап культивирования бактерий на бентонитовом материале, содержащем натриевую форму монтмориллонита, для чего емкость с полученной биокомпозицией помещают в орбитальный шейкер, где перемешивают ее при скорости 100 об/мин при температуре 36°C в течение 24 ч.

После завершения культивирования биокомпозицию разливают в стерильные стеклянные банки с закручивающимися крышками и подвергают лиофильной сушке. Сначала проводят предварительное замораживание при минус 40°C в течение 24 ч, затем основная сушка - при минус 50°C в течение 24 ч, после чего проводят остаточное высушивание при минус 20°C до достижения конечной влажности не более 5%.

Использование Трилона Б в качестве стабилизатора дисперсии монтмориллонитовых частиц обеспечивает равномерное распределение бактериальных клеток по минеральной матрице. Благодаря этому бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D равномерно прикрепляются к поверхности монтмориллонитовых частиц, что повышает эффективность подавления микотоксинов. Бентонитовый материал, содержащий монтмориллонит натриевой формы, применяемый в качестве натурального сорбента, расширяет возможности композиционных препаратов, способствующих нейтрализации микотоксинов и улучшению перистальтики желудочно-кишечного тракта.

Уникальность предлагаемого способа заключается также в использовании штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, который продуцирует значительное количество биологически активных метаболитов. Эти метаболиты оказывают активное действие против фитопатогенных грибов, таких как *Aspergillus unguis*, и демонстрируют антагонистический эффект по отношению к *Escherichia coli*.

Штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D был выделен из почвы придорожной зоны села Кленовое в Прохоровском районе Белгородской области, зарегистрирован в коллекции «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»». Дата депонирования: 07.06.2023.

Культуральные и морфологические свойства штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D: Клетки *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D имеют палочковидную форму и располагаются поодиночке или попарно. Колонии формируются на агаре с 3% пептоном на второй день инкубации при температуре 35°C. Они характеризуются белым цветом, блестящей поверхностью, непрозрачностью, широкими выпуклыми формами и неровными краями, которые со временем становятся более гладкими. Штамм способен образовывать споры

и проявляет положительную реакцию на окраску по Граму.

Физиолого-биохимические свойства *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D. Штамм обладает протеолитической, целлюлолитической, липолитической, амилалитической активностью и активностью каталазы. Также штамм способен выделять аммиак и восстанавливать нитраты, что свидетельствует о его способности к фиксации азота и денитрификации. При этом он не проявляет активность лецитиназы и уреазы, не образует индол и сероводород. *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D хорошо растет на средах с сахарозой, D-глюкозой, лактозой, D-фруктозой, цитратом натрия и ацетатом натрия, но не растет на средах с салициловой, сорбиновой, бензойной, винной кислотами и ацетатом свинца. Он является аэробным организмом. *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D проявляет антагонистическую активность в отношении *Escherichia coli* O157:H7, *Aspergillus unguis* VKM F-1754 и бактерий рода *Ralstonia*.

Таким образом, предложенный способ получения симбиотической кормовой добавки для животных является инновационным и актуальным решением. Он объединяет пробиотический эффект *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D и сорбционные свойства бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, обработанного с применением трилона Б, что позволяет создать безопасный и эффективный продукт для повышения качества кормов и улучшения здоровья сельскохозяйственных животных и птиц.

Пример 1. Осуществление способа получения симбиотической кормовой добавки, содержащей 10^9 КОЕ.

Берут 350 мл 12-часовой культуры *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, выращенной на среде LB, содержащей 1,5% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% хлорида натрия, разбавленных дистиллированной водой. Проводят накопление биомассы бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D методом глубинного культивирования в биореакторе на питательной среде следующего состава мас. %: сухая молочная сыворотка 3, хлорид натрия 0,06, дигидрофосфат калия 0,06, карбонат натрия 0,06 и сульфат железа 7-водный 0,006, вода дистиллированная свежеприготовленная остальное. Параметры культивирования: Ph $7 \pm 0,15$, поддерживают с помощью 20% растворов гидроксида натрия и/или соляной кислоты, концентрация растворенного кислорода $70 \pm 5\%$, температура 30°C . Период культивирования длится 36 ч. Полученную культуральную жидкость центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 минут, осадок ресуспендируют в 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Получают биомассу штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D содержащего 10^9 КОЕ.

Для подготовки сорбента бентонитовый материал, содержащий монтмориллонит натриевой формы, предварительно измельчают до частиц размером не более 100 мкм, затем подвергают стерилизации в сухожаровом шкафу при 180°C в течение 1,5 ч. После стерилизации бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, в него добавляют раствор Трилона Б концентрацией 0,25 мг на литр, в массовом соотношении 1:1, перемешивают до пастообразного состояния, в виде однородной массы без сухих комков.

В биомассу штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, содержащего 10^9 колониеобразующих единиц по частям добавляют сорбент в виде пасты в массовом соотношении 5:1, тщательно перемешивая после каждого добавления. Смесь биомассы и сорбента гомогенизируют с помощью лабораторного миксера в течение 15 минут при скорости 50 об/мин, контролируя процесс, чтобы предотвратить образование пены. При недостаточной влажности, менее 40%, смесь увлажняют физиологическим

раствором до получения биокомпозиции однородной, кашеобразной консистенции.

Далее емкость с биокомпозицией ставят на орбитальный шейкер и перемешивают при 100 об/мин и температуре 36° С в течение 24 ч.

В стерильных условиях биокомпозицию разливают в предварительно

5 простерилизованные стеклянные банки с закручивающимися крышками и подвергают лиофильной сушке. Лиофилизацию проводят в несколько этапов: предварительное замораживание при минус 40°С в течение 24 ч, основная сушка при минус 50°С в течение 24 ч и остаточное высушивание при минус 20°С до достижения конечной влажности не более 5%.

10 Продукт представляет собой сухую, пористую, легкую массу с однородной структурой. Внешне он может выглядеть как мелкодисперсный порошок или хрупкие гранулы, сохраняющие пористую структуру, характерную для лиофилизированных материалов.

15 Пример 2. Осуществление способа получения симбиотической кормовой добавки, содержащей 10^6 КОЕ.

Берут 350 мл 12-часовой культуры *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, выращенной на среде LB, содержащей 1% пептона, 0,25% дрожжевого экстракта и 0,5% хлорида натрия, разбавленных дистиллированной водой. Проводят накопление биомассы бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D методом глубинного культивирования в
20 биореакторе на питательной среде следующего состава мас. %: сухая молочная сыворотка 1,5, хлорид натрия 0,03, дигидрофосфат калия 0,03, карбонат натрия 0,03 и сульфат железа 7-водный 0,003, вода дистиллированная свежеприготовленная остальное. Параметры культивирования: Ph $7 \pm 0,15$, поддерживают с помощью 20% растворов гидроксида натрия и/или соляной кислоты, концентрация растворенного кислорода
25 $70 \pm 5\%$, температура 30°С. Период культивирования длится 36 ч. Полученную культуральную жидкость центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 минут, осадок ресуспендируют в 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Получают биомассу штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D 10^6 КОЕ.

30 Для подготовки сорбента бентонитовый материал, содержащий монтмориллонит натриевой формы, предварительно измельчают до частиц размером не более 100 мкм, затем подвергают стерилизации в сухожаровом шкафу при 180°С в течение 1,5 ч. После стерилизации бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, в него добавляют раствор Трилона Б концентрацией 0,25 мг на литр, в массовом
35 соотношении 1:1, перемешивают до пастообразного состояния, в виде однородной массы без сухих комков.

В биомассу штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D содержащего 10^6 колониеобразующих единиц по частям добавляют сорбент в виде пасты в массовом соотношении 5:1, тщательно перемешивая после каждого добавления. Смесь биомассы
40 и сорбента гомогенизируют с помощью лабораторного миксера в течение 15 минут при скорости 50 об/мин, контролируя процесс, чтобы предотвратить образование пены. При недостаточной влажности, менее 40%, смесь увлажняют физиологическим раствором до получения биокомпозиции однородной, кашеобразной консистенции.

Далее емкость с биокомпозицией ставят на орбитальный шейкер и перемешивают
45 при 100 об/мин и температуре 36°С в течение 24 ч.

В стерильных условиях биокомпозицию разливают в предварительно простерилизованные стеклянные банки с закручивающимися крышками и подвергают лиофильной сушке. Лиофилизацию проводят в несколько этапов: предварительное

замораживание при минус 40°C в течение 24 ч, основная сушка при минус 50°C в течение 24 ч и остаточное высушивание при минус 20°C до достижения конечной влажности не более 5%.

Продукт представляет собой сухую, пористую, легкую массу с однородной структурой. Внешне он может выглядеть как мелкодисперсный порошок или хрупкие гранулы, сохраняющие пористую структуру, характерную для лиофилизированных материалов.

Пример 3. Проверка эффективности биокомпозиции, полученной по примеру 1 и 2.

Проверка была проведена в отношении микотоксина зеараленон, который содержится во всем мире в ряде зерновых культур, таких как кукуруза, ячмень, овес, пшеница, рис и сорго, используемых в качестве корма для птиц.

С целью проверки эффективности подавления зеараленона биокомпозицией, полученной по примеру 1 и 2, была проведена экстракция зерна, зараженного следующими видами плесневых грибов: *Aspergillus unguis* F-1754, *Bipolaris sorokiniana* F-4006, *Alternaria brassicicola* F-1864, *Rhizoctonia solani* F-895, *Heterobasidion annosum* F-713, *Pythium vexans* F-1193. Все грибы показали выделение зеараленона в различных концентрациях. Биокомпозиция была приготовлена в двух вариантах: один вариант содержал КОЕ *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, равное 10^9 , второй - 10^6 .

Микотоксины получали следующим образом: зерно инфицировали культурами грибов штаммов *Aspergillus unguis* F-1754, *Bipolaris sorokiniana* F-4006, *Alternaria brassicicola* F-1864, *Rhizoctonia solani* F-895, *Heterobasidion annosum* F-713 и *Pythium vexans* F-1193. Сначала на зерно наносили суспензию спор выбранных грибов, затем помещали образцы в инкубационные условия. Для создания необходимой влажной среды, способствующей активному росту грибов и продуцированию микотоксинов, зерно регулярно обрызгивали водой на протяжении двух недель. В этот период грибы выделяли микотоксины, которые затем использовались для дальнейшего анализа.

Для каждого вида плесневых грибов были внесены в асептических условиях в ламинарном боксе 2 класса защиты под включенной вытяжкой следующие навески биокомпозиции: 0,5 г и 1 г соответственно. Таким образом, было подготовлено:

- 6 банок, содержащих 0,5 гр навески биокомпозиции с КОЕ *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D равное 10^6 ,

- 6 банок, содержащих 0,5 гр навески биокомпозиции с КОЕ *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D равное 10^9 ,

- 6 банок, содержащих 1,0 гр навески биокомпозиции с КОЕ *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D равное 10^6 ,

- 6 банок, содержащих 1,0 гр навески биокомпозиции с КОЕ *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D 10^9 ,

6 банок контрольных, без внесения биокомпозиции.

Навески зерна инкубировали в шейкер-инкубаторе при температуре 35-40°C в течение 24 ч. После инкубации проводили экстракцию целевых соединений, используя смесь ацетонитрил : вода : муравьиная кислота в объемном соотношении 79:20:1. Встряхивание осуществляли в течение 10 минут, затем центрифугировали при 2700 об/мин в течение 5 минут. Далее экстракт обрабатывали путем добавления 1 мл гексана, насыщенного ацетонитрилом, и повторного встряхивания в течение 3 минут. После расслоения фаз нижний слой отбирали, смешивали с деионизированной водой и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Оставшийся растворитель удаляли с помощью вакуумной центрифуги.

Далее проводили анализ микотоксинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии - ВЭЖХ. Для идентификации микотоксинов применяли стандартный раствор зеараленона с концентрацией 99,7 мкг на мл. Раствор зеараленона готовили, растворяя его в смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 50:50.

В результате анализа были получены результаты, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация зеараленона в образцах.

Вид гриба	Концентрация зеараленона в образцах, мкг/мл				
	Контроль	Навеска 0,5 г биоконпозиции		Навеска 1 г биоконпозиции	
		10 ⁶	10 ⁹	10 ⁶	10 ⁹
F-4006	86,44	37,98	15,99	5,15	4,38
F-1864	20,44	7,55	4,32	1,95	2,17
F-1754	18,33	11,30	4,96	1,78	3,84
F-895	15,70	5,74	10,62	4,49	7,32
F-713	8,42	3,16	2,77	3,61	2,29
F-1193	84,91	8,22	2,59	7,26	0,07

По полученным данным было рассчитано понижение концентрации зеараленона в процентах, для более точной оценки эффективности подавления зеараленона штаммом *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация зеараленона в образцах, %.

Вид гриба	Концентрация зеараленона в образцах, %				
	Контроль	Навеска биоконпозиции 0,5 г		Навеска биоконпозиции 1 г	
		10 ⁶	10 ⁹	10 ⁶	10 ⁹
F-4006	100	53,02	18,51	7,19	5,06
F-1864	100	61,69	21,13	15,93	10,61
F-1754	100	60,21	27,06	32,13	20,92
F-895	100	23,81	68,94	16,14	6,02
F-713	100	21,66	33,07	9,88	27,13
F-1193	100	59,81	3,05	52,84	0,08

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о высокой эффективности штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D в подавлении зеараленона. При навеске 1 г этой биоконпозиции наблюдается многократное уменьшение уровня микотоксина, что подчеркивает ключевую роль данного штамма.

Удельная поверхность бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы составляет 60 м²/г, удельный объем пор - 0,083 см³/г, а средний размер пор равен 55,5 Å. Эти параметры свидетельствуют о развитой пористой структуре, способствующей эффективной адсорбции.

Таким образом, заявленный способ получения симбиотической кормовой добавки обеспечивает достижение поставленной задачи. В полученной биоконпозиции *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D эффективно снижает концентрацию зеараленона, а также выделяет вещества, которые стимулируют микрофлору кишечника и подавляет микотоксины. А бентонитовый материал, содержащий монтмориллонит натриевой формы, обладает развитой пористой структурой и высоким содержанием активного монтмориллонита,

и одновременно является питательной средой для штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D, что обеспечивает значительную сорбционную активность.

(57) Формула изобретения

Способ получения кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птиц, включающий смешивание пробиотического компонента и стерильного сорбента при комнатной температуре, лиофильную сушку при минус 50°C до достижения влажности не более 5%, отличающийся тем, что в качестве пробиотического компонента используют штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ 10^6 , выращенный на питательной среде, содержащей мас. %: сухой молочной сыворотки 1,5, хлорида натрия 0,03, дигидрофосфата калия 0,03, карбоната натрия 0,03 и сульфата железа 7-водный 0,003, вода дистиллированная - остальное или в качестве пробиотического компонента используют штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В3728D с биомассой КОЕ 10^9 , выращенный на питательной среде, содержащей мас. %: сухой молочной сыворотки - 3, хлорида натрия 0,06, дигидрофосфата калия 0,06, карбоната натрия 0,06 и сульфата железа 7-водного - 0,006 и вода дистиллированная - остальное, в качестве сорбента используют пасту, полученную путем смешения измельченного стерильного бентонитового материала, содержащего монтмориллонит натриевой формы, с водным раствором Трилона Б в массовом соотношении 1:1, причем раствор Трилона Б готовят из расчета 0,25 мг на литр дистиллированной воды, затем к пробиотическому компоненту с биомассой КОЕ 10^6 - 10^9 добавляют по частям сорбент в виде пасты, в массовом соотношении 5:1, тщательно перемешивая после каждого добавления со скоростью 50 об/мин, не давая образоваться пене, и при необходимости смачивая физиологическим раствором до получения биоконпозиции в виде однородной кашеобразной смеси влажностью 40%, после чего емкость с полученной биоконпозицией ставят в орбитальный шейкер, где перемешивают ее при скорости 100 об/мин при температуре 36°C в течение 24 ч, перед лиофильной сушкой осуществляют предварительное замораживание при минус 40°C в течение 24 ч, а после основной сушки при минус 50°C в течение 24 ч, проводят остаточное высушивание при минус 20°C до достижения конечной влажности не более 5%.