



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102409007 A  
(43) 申请公布日 2012. 04. 11

(21) 申请号 201110184359. 5  
(22) 申请日 2011. 07. 04  
(71) 申请人 天津市育琪生物技术有限公司  
地址 300308 天津市南开区华苑产业园梓苑  
路 6 号办公楼 B 座 605  
申请人 天津工业生物技术研究  
(72) 发明人 刘晋生 孙骏跃 宋诤 谭明  
李丽 刘阳 郑雯 徐健勇  
吴雅倩

(51) Int. Cl.  
C12N 1/20 (2006. 01)  
A23K 1/16 (2006. 01)  
C12R 1/125 (2006. 01)  
C12R 1/10 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称  
一种芽孢杆菌微生态制剂及其液固结合发酵  
制备工艺

(57) 摘要  
本发明提供一种微生物饲料添加剂及其制备方法。主要工艺过程是以液体培养基在 35~37℃ 条件下分别培养枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌 17~24 小时, 与经灭菌后的含有麸皮和葡萄籽提取物的固体培养基进行混匀接种, 随后在 35~37℃ 条件下进行短期(1~3 小时) 固体发酵, 利用芽孢杆菌在环境变化时容易产生芽孢的特点, 使代谢活跃的菌体经短期固体发酵后迅速成熟并生成芽孢。随后进行粉碎、包装, 制成微生物饲料添加剂, 有效菌数≥ 1×10<sup>8</sup>CFU/g, 以 0. 1% 的量添加于畜禽类饲料中, 用于降低畜禽腹泻率, 降低染病率, 提高采食量, 提高日增重。

1. 一种微生态制剂,由枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活菌分别与固体载体组成。
2. 根据权利要求1所述的一种微生态制剂,其特征在于:使用的固体培养基中含有麸皮和1%~2% (质量比)的葡萄籽提取物。
3. 根据权利要求1所述微生态制剂,其制备方法包括以下步骤:
  - 1) 一级种子培养:一级液体种子培养基:蛋白胨 16g/L,酵母粉 10g/L, NaCl 5g/L, pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min;培养条件:将枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌分别接种于固体 LB 培养基平板, 37℃培养 24h,挑取单菌落接种于 10ml 液体种子培养基,于旋转式摇床 200rpm, 37℃培养 14~18h,得到一级种子液;
  - 2) 二级种子培养:二级液体种子培养基:蛋白胨 16g/L,酵母粉 10g/L, NaCl 5g/L, pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min;培养条件:于 1L 三角瓶中装入 200ml 二级液体种子培养基,分别接种 1%~2% 上述一级种子液, 37℃, 200rpm 培养,发酵 10~18h,得到二级种子液;
  - 3) 高密度液体发酵:补料液:葡萄糖 500g/L,蛋白胨 200g/L;液体培养基:蛋白胨 16g/L,酵母粉 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min;培养条件:于 5~50L 发酵罐中装入 50% 体积的液体培养基,接种培养基体积 1~2% 的上述二级种子液, 37℃, 搅拌 200rpm 培养 6~8h 后,开始流加补料液,流速 50ml/min,发酵至 17~24h,停止发酵,得到高密度菌体发酵液;
  - 4) 固相载体处理:固相培养基(麸皮和质量比 1%~2% 的葡萄籽提取物)采用微波干燥杀菌,功率 10kW 时间 30min,水分含量≤5%;
  - 5) 液固混配:将步骤3)中所得的菌体发酵液按照重量比 1~10% 与步骤4)中处理后的固相培养基分别混合,充分拌匀,得到发酵曲;
  - 6) 快速固体发酵:将步骤5)中所得发酵曲在 35~37℃条件下静置 1~3h,进行快速固体发酵,使菌种成熟并产生芽孢,得到固体发酵产物;
  - 7) 粉碎:将步骤6)中得到的上述固体发酵产物粉碎,过 40~60 目筛,经过分袋包装得到成品微生态制剂。
4. 根据权利要求3所述微生态制剂的制备方法,其特征在于:使用液体培养基高密度发酵枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌后,按照重量比 1~10% 分别与经灭菌后的固体培养基进行混匀接种,随后在 35~37℃条件下进行超短期(1~3 小时)固体发酵。

## 一种芽孢杆菌微生态制剂及其液固结合发酵制备工艺

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种以枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌为主的微生态制剂,还涉及这种微生态制剂的液固结合发酵制备工艺。

### 背景技术

[0002] 微生态制剂是采用有益微生物,经培养、发酵、干燥、加工等工艺制成含有活菌的活菌剂或者包含菌体及其代谢产物的制剂,具有抗病、治病、促生长等功能,而且具有无残留污染,无副作用和不产生抗药性等特点。枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌是微生态制剂的理想菌种,包括在我国农业部公布的可直接饲喂动物的饲料级微生物添加剂中。它们耐酸,耐碱,耐高温,在制粒过程中及动物胃肠道中均能保持稳定;枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌能分泌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶以及多种氨基酸,从而提高饲料转化率,促进动物生长,缩短饲养周期;并且能促进双歧杆菌、乳酸杆菌和梭菌等厌氧菌的生长,有效抑制肠道中肠杆菌和肠球菌等需氧菌的生长,促进宿主肠道正常菌群生长,维持肠道微生态平衡。

[0003] 传统微生态制剂的制备多采用固态发酵工艺,固态发酵工艺简单,生产成本较低,但存在产品质量不稳定,发酵过程易污染,干燥过程能耗大等缺点。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是:针对现有制备芽孢杆菌微生态制剂的技术工艺活菌数不稳定,易污染杂菌等缺陷,提出一种新的制备芽孢杆菌微生态制剂的工艺方法。该方法采用液固结合制备芽孢杆菌微生态制剂,工艺简单,不易污染杂菌,活菌数稳定,可达  $10^8$  个活菌/g 以上。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:本发明提供一种微生物饲料添加剂及其制备方法。其特征是:以液体培养基 A,在  $35\sim 37^\circ\text{C}$  条件下分别培养枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)  $17\sim 24$  小时,制成扩培液,菌数达到  $10^{10}$ /mL 以上,并按照重量比  $5\sim 10\%$  与经灭菌后的固体培养基 B 进行混匀接种,随后在  $35\sim 37^\circ\text{C}$  条件下进行超短期( $1\sim 2$  小时)固体发酵,利用了芽孢杆菌在环境变化时容易产生芽孢的特点,使代谢活跃的菌体在固体培养基中经短期发酵后迅速成熟并生成芽孢。随后进行粉碎、包装,制成微生物饲料添加剂。

[0006] 液体培养基 A 的组成为:1.0% (m/V) 酵母浸粉,1.6% (m/V) 蛋白胨,0.5% (m/V) NaCl,水, pH6.0~7.0。

[0007] 固体培养基 B 的组成为:1.2% (m/m) 葡萄籽提取物,98.8% (m/m) 麸皮。

[0008] 制备步骤如下。

[0009] 出发菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),保藏编号:CICC 20037;地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),保藏编号 CICC 23584。

[0010] 1)一级种子培养:一级液体种子培养基:蛋白胨 16g/L,酵母粉 10g/L,NaCl 5g/L,

pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min; 培养条件: 将枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌分别接种于固体 LB 培养基平板, 37℃培养 24h, 挑取单菌落接种于 10mL 液体种子培养基, 于旋转式摇床 200rpm, 37℃培养 14~18h, 得到一级种子液;

2) 二级种子培养: 二级液体种子培养基: 蛋白胨 16g/L, 酵母粉 10g/L, NaCl 5g/L, pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min; 培养条件: 于 1L 三角瓶中装入 200mL 二级液体种子培养基, 分别接种 1%~2% 上述一级种子液, 37℃, 200rpm 培养, 发酵 10~18h, 得到二级种子液;

3) 高密度液体发酵: 补料液: 葡萄糖 500g/L, 蛋白胨 200g/L; 液体培养基: 蛋白胨 16g/L, 酵母粉 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.0~7.0, 121℃灭菌 20min; 培养条件: 于 5~50L 发酵罐中装入 50% 体积的液体培养基, 接种培养基体积 1~2% 的上述二级种子液, 37℃, 搅拌 200rpm 培养 6~8h 后, 开始流加补料液, 流速 50mL/min, 发酵至 17~24h, 停止发酵, 得到高密度菌体发酵液;

4) 固相载体处理: 固相培养基(麸皮和质量比 1%~2% 的葡萄籽提取物)采用微波干燥杀菌, 功率 10kW 时间 30min, 水分含量 ≤ 5%;

5) 液固混配: 将步骤 3) 中所得的菌体发酵液按照重量比 1~10% 与步骤 4) 中处理后的固相培养基分别混合, 充分拌匀, 得到发酵曲;

6) 快速固体发酵: 将步骤 5) 中所得发酵曲在 35~37℃条件下静置 1~3h, 进行快速固体发酵, 使菌种成熟并产生芽孢, 得到固体发酵产物;

7) 粉碎: 将步骤 6) 中得到的上述固体发酵产物粉碎, 过 40~60 目筛, 经过分袋包装得到成品微生态制剂。

[0011] 步骤 1) 中固体 LB 培养基配方: 蛋白胨 16g/L, 酵母粉 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.0~7.0, 琼脂 15g/L, 121℃灭菌 20min。

[0012] 步骤 3) 中液体发酵产物活菌数约为  $10^{10}$ /mL。

[0013] 步骤 6) 中产品的活菌数约为  $10^8$ /g, 芽孢率 ≥ 80%。

[0014] 步骤 7) 中得到的芽孢杆菌微生态制剂以 0.1% 的量添加于畜禽类饲料中, 用于降低畜禽腹泻率, 提高采食量, 提高日增重。

[0015] 本发明所述方法采用液固结合发酵制备工艺, 即在液体发酵罐中进行单一菌种高密度发酵, 这不仅实现了严格意义上的纯培养, 而且活菌数达到  $10^{10}$ /mL 以上, 然后再进行液体与固体混配, 从而制成各种不同规格的液体或固体产品。产品质量稳定可控, 能耗大幅下降, 生产过程无三废产生, 属于清洁生产工艺。

[0016] 具体实施方式:

下面结合实施例来进一步详细阐述本发明。

[0017] 实施例 1: 地衣芽孢杆菌微生态制剂的液固结合发酵工艺。

[0018] 将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)接种于固体 LB 培养基平板, 37℃培养 24h, 挑取单菌落接种于液体种子培养基(蛋白胨 1.6%, 酵母粉 1.0%, NaCl 0.5%, pH6.0~7.0), 于旋转式摇床 200rpm, 37℃培养 16h, 得到一级种子液。于 1L 三角瓶中装入 20% 体积的液体种子培养基, 分别接种 1% 上述一级种子液, 37℃, 200rpm 培养, 发酵 16h, 得到二级种子液。于 10L 发酵罐中装入 50% 体积的液体培养基, 接种 1% 上述二级种子液, 37℃, 搅拌转速 200rpm 培养 6~8h 后, 开始流加补料液, 流速 50mL/min, 发酵至 17~24h, 停止发酵。麸皮和质量比 1%~2% 的葡萄籽提取物采用微波干燥杀菌, 功率 10kW 时间 30min 水分含量 5%, 按照质量比

1~10% 的比例将发酵产物与微波处理后的固体培养基混合,充分拌匀,得到发酵曲,将发酵曲在 37℃ 条件下静置 1~3h,进行快速固体发酵,使菌种成熟并产生芽孢,得到固体发酵产物。将发酵产物粉碎,过 40~60 目筛,得到枯草芽孢杆菌微生态制剂。

[0019] 实施例 2:枯草芽孢杆菌微生态制剂的液固结合发酵工艺。

[0020] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 接种于固体 LB 培养基平板,37℃ 培养 24h,挑取单菌落接种于液体种子培养基(蛋白胨 1.6%,酵母粉 1.0%, NaCl 0.5%, pH6.0~7.0),于旋转式摇床 200rpm,37℃ 培养 16h,得到一级种子液。于 1L 三角瓶中装入 20% 体积的液体种子培养基,分别接种 1% 上述一级种子液,37℃,200rpm 培养,发酵 16h,得到二级种子液。于 10L 发酵罐中装入 50% 体积的液体培养基,接种 1% 上述二级种子液,37℃,搅拌转速 200rpm 培养 6~8h 后,开始流加补料液,流速 50mL/min,发酵至 17~24h,停止发酵。麸皮和质量比 1%~2% 的葡萄籽提取物采用微波干燥杀菌,功率 10kW 时间 30min 水分含量 5%,按照质量比 1~10% 的比例将发酵产物与微波处理后的固体培养基混合,充分拌匀,得到发酵曲,将发酵曲在 37℃ 条件下静置 1~3h,进行快速固体发酵,使菌种成熟并产生芽孢,得到固体发酵产物。将发酵产物粉碎,过 40~60 目筛,得到地衣芽孢杆菌微生态制剂。