



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101982089 A

(43) 申请公布日 2011.03.02

(21) 申请号 201010281964.X

(22) 申请日 2010.09.15

(83) 生物保藏信息

1925 2007.01.22

(71) 申请人 北京大北农业科技集团股份有限公司

地址 100080 北京市海淀区中关村大街 27  
号中关村大厦 14 层大北农集团

申请人 北京百林康源生物技术有限责任公  
司

(72) 发明人 宋维平 聂实践

(51) Int. Cl.

A23K 1/18(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/145(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

一种兽用微生态制剂及其制备方法与用途

(57) 摘要

本发明涉及一种兽用微生态制剂及其制备方法与用途,属于微生态制剂技术领域。该微生态制剂的活性成分为酪酸梭菌 CGMCC No.1925 菌粉。本发明的兽用微生态制剂活菌含量高;对抗生素有耐受性,对一些抗生素不敏感或敏感性弱;而且,该微生态制剂可替代一些抗生素;能耐胃酸、胆盐、高温等。另外,本发明微生态制剂的制备方法简单,用本发明的制备方法制备出的微生态制剂,酪酸梭菌活菌含量高。本发明的兽用微生态制剂有较好的市场前景。

1. 一种兽用微生态制剂,其特征在于活性成分为酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌粉。
2. 权 1 所述的兽用微生态制剂,其特征在于酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌浓度为  $1 \times 10^6 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ 。
3. 权 2 所述的兽用微生态制剂,其特征在于酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌浓度为  $1 \times 10^9 \text{CFU/g}$ 。
4. 权 1 ~ 3 任一项所述的兽用微生态制剂,其特征在于进一步包含载体,载体为石粉、硫酸钾铝、玉米芯粉中的任一种或两种。
5. 如权 1 ~ 4 任一项所述的兽用微生态制剂的制备方法,其特征在于制备过程如下:
  - (1) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的菌种复壮;
  - (2) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的培养、发酵:将复壮菌种接种于 CBM 液体培养基中,37℃ 恒温箱中培养 24 小时,芽孢率在 75% 以上后,接种于发酵罐中,接种量 10%,37℃ 恒温培养 24 小时,芽孢率达到 75% 以上时,使发酵液降温至 20℃;
  - (3) 连续离心收集菌体,将菌泥用保护液和载体调配至固型物浓度 5-10%,以进口温度 115℃,出口温度 80℃ 的条件进行喷雾干燥,收集菌粉,即得;CBM 培养基配方:葡萄糖 1.0%、酪蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%、牛肉膏 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3%、NaCl 0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.4%、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCO}_3$  0.2%、琼脂 2.0% (固体培养基用),pH 值:7.2,灭菌条件:121℃,30 分钟。
6. 权 5 所述的兽用微生态制剂的制备方法,其特征在于所述的保护液为 10% 的脱脂奶。
7. 如权 1 ~ 4 任一项所述的兽用微生态制剂在制备饲料添加剂中的应用。

## 一种兽用微生态制剂及其制备方法与用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种兽用微生态制剂及其制备方法与用途,属于微生态制剂技术领域。

### 背景技术

[0002] 兽用微生态制剂是一种绿色、安全的饲料添加剂,具有防病、增强机体免疫力、促进生长、增加体重等多种功能,且无污染,无残留,不产生抗药性。

[0003] 目前,市场上的微生态制剂存在以下几个方面的问题:(1) 活菌含量低,而研究表明,如果一种菌在盲肠内容物中的浓度低于  $10^7$  个/g,则该菌产生的酶及代谢产物不足以影响宿主,难以满足治疗需要;(2) 不耐抗生素;(3) 对高温、胃酸和胆盐不稳定,致使只有少数菌株进入肠道后仍具有活性,达不到发挥作用所需的活菌数量;(4) 不稳定,保存期短。由于微生态制剂存在的这些问题,从而影响了其在动物上的应用效果,限制了微生态制剂的广泛应用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种对抗生素有耐受性、活菌含量高、稳定、保存期长的兽用微生态制剂。该兽用微生态制剂中主要活性成分是酪酸梭菌 CGMCCNo. 1925 菌粉。

[0005] 本发明的另一目的是提供该兽用微生态制剂的制备方法和用途。

[0006] 本发明的目的是通过如下技术方案实现的:

[0007] 本发明提供一种兽用微生态制剂,该制剂的活性成分为酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌粉。

[0008] 其中,所述的酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) CGMCC No. 1925 为申请人从动物肠道中分离、选育得到,经中国工业微生物菌种保藏管理中心鉴定,并于 2007 年 1 月 22 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(简称 CGMCC),保藏号为: CGMCC No. 1925。本发明的酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 对胆汁的耐受性很高,胆汁处理对酪酸梭菌的活性几乎没有影响;短时间内可耐强酸,如 pH 1.0 或 pH 2.0,在 pH 3.0、4.0 条件下可长时间耐酸,酪酸梭菌的活性基本不受影响;耐高温,具有较好的热存放稳定性;对一些抗生素不敏感,如对硫酸粘杆菌素不敏感,对诺氟沙星敏感性弱。

[0009] 本发明的兽用微生态制剂中,酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/g  $\sim$   $1 \times 10^{10}$  CFU/g。

[0010] 进一步,酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/g。

[0011] 本发明的兽用微生态制剂还可进一步包含载体,载体为石粉、硫酸钾铝、玉米芯粉中的任一种或两种。

[0012] 本发明还提供了该兽用微生态制剂的制备方法,其制备过程如下:

[0013] (1) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的菌种复壮;

[0014] 菌种的复壮代数可根据实际需要进行,但申请人在发明过程中发现,酪酸梭菌

CGMCC No. 1925 经过 4 代复壮,第 4 代发酵液芽孢率高且平板记数较高,因此申请人优选第四代作为复壮菌种;

[0015] (2) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的培养、发酵:将复壮菌种接种于 CBM 液体培养基中,37℃ 恒温箱中培养 24 小时,芽孢率在 75% 以上后,接种于发酵罐中,接种量 10%,37℃ 恒温培养 24 小时,芽孢率达到 75% 以上时,使发酵液降温至 20℃;

[0016] (3) 连续离心收集菌体,将菌泥用保护液和载体调配至固型物浓度 5-10%,以进口温度 115℃,出口温度 80℃ 的条件进行喷雾干燥,收集菌粉,即得;

[0017] 菌粉的收集方法可为其它方法,如用 45℃ 左右气流干燥,干燥后制成菌粉,但申请人发现喷雾干燥制备的菌粉活菌含量高,所以本发明优选喷雾干燥。

[0018] 其中,CBM 培养基配方:葡萄糖 1.0%、酪蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%、牛肉膏 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3%、NaCl 0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.4%、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCO}_3$  0.2%、琼脂 2.0% (固体培养基用),pH 值:7.2,灭菌条件:121℃,30 分钟。

[0019] 其中,所述的保护液为 10% 的脱脂奶。

[0020] 本发明还提供了该兽用微生态制剂用于制备饲料添加剂的用途。

[0021] 本发明的兽用微生态制剂活菌含量高,酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 菌浓度可高达  $1 \times 10^{10}$  CFU/g;对抗生素有耐受性,在动物的生长过程中,不可避免的要使用抗菌素对动物疾病进行治疗,为了防止疾病的发生和促进生长,国内的一些饲料生产企业和养殖企业在饲料中添加亚剂量的抗菌素,这种养殖行为对动物肠道微生态会产生很大的影响,很多微生态制剂在此种情况下而不能发挥其原有的作用,但本发明的微生态制剂对某些抗生素不敏感或敏感性弱,如对硫酸粘杆菌素不敏感,对诺氟沙星敏感性弱,因此本发明的微生态制剂在制备及使用过程中,就可不受这些抗生素的影响,即使这些抗生素存在,也能发挥本发明微生态制剂的活性成分——酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 增强机体免疫力、促进生长、增加体重等益生作用;而且,微生态制剂因其绿色、环保可替代抗生素而受人类青睐,本发明的微生态制剂在研究中还发现,本发明的微生态制剂可真正替代一些抗生素,如黄霉素,二者抗病能力相当;本发明的微生态制剂耐胃酸、胆盐、高温等,菌株进入肠道后仍具有活性,从而发挥其作用;且该制剂在 25℃、40℃ 温度的保存条件下活性基本稳定,随存放时间的延长,活性虽有下降,但活性损失不大;另外,本发明微生态制剂的制备方法简单,各种实验条件都经过了申请人的实验研究,用本发明的制备方法制备出的微生态制剂,酪酸梭菌活菌含量高,在制备过程中酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 表现较好的抗机械加工性,造粒加工后,活性基本没有被破坏,在饲料中的稳定性较好等。

[0022] 通过下列实施例将更具体的说明本发明,但是应理解所述实施例仅是为了说明本发明,而不是以任何方式限制本发明的范围。

## 具体实施方式

[0023] 实施例 1 酪酸梭菌的分离、鉴定

[0024] 样品采集:菌种分离的样品来自动物肠道中。

[0025] 菌体为直或弯曲,端圆,单个或成对、短链偶见长丝状菌体,周生鞭毛,能运动;革兰氏阳性,在老培养物中能变为阴性;菌体中常有圆形或椭圆形芽孢,使菌体中部膨大成梭形,孢子偏心或次端生、无孢子外壁或附属丝;表面菌落圆形或不规则,直径 1-3 毫米,稍

凸,白色至奶油色,表面有光泽至无光泽 ;该菌为厌氧菌,在合适的培养基中生长良好,并产气。经中国工业微生物菌种保藏管理中心鉴定为酪酸梭菌 (Clostridium Butyricum)。

[0026] 实施例 2 酪酸梭菌的培养

[0027] 1. 材料与方法

[0028] (1) 菌种 :酪酸梭菌 CGMCC No. 1925

[0029] (2) 器材 :光学显微镜,厌氧罐,恒温培养箱等。

[0030] (3) 药品 :结晶紫染液,石炭酸复红染液。

[0031] (4) 培养方式 :三角瓶液体深层静置培养 (非严格厌氧条件)。平皿固体培养需置于厌氧罐中进行。

[0032] (5) 检测方法 :菌数测定可用平板倾注法和血球记数法。菌体形态用结晶紫染液及石炭酸复红染液染色后于显微镜下观察。

[0033] 2. 结果

[0034] (1) 碳氮源配比试验

[0035] 以葡萄糖为碳源,氮源选用蛋白胨、酵母粉及牛肉浸膏组成复合氮源提供菌体生长所需的生长因子。实验中固定培养基其他组分用量,分别以碳氮源为变量进行对比培养,以下是不同碳氮源用量及比例的培养结果。

[0036] ①碳源用量试验 :以葡萄糖为碳源,分为 6 个用量水平进行培养,结果见表 1。

[0037] 表 1. 葡萄糖用量对比试验结果

[0038]	试验组	1	2	3	4	5	6
	葡萄糖 (%)	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
	24hr 菌浓 cfu/ml	$1.2\times10^6$	$2.5\times10^7$	$7.5\times10^8$	$6.0\times10^8$	$4.8\times10^8$	$3.0\times10^8$

[0039] 结果表明碳源在 1.0%水平时,菌体生长较好,菌数较高。

[0040] ②氮源配比试验 :鉴于酪酸梭菌菌株的生长要求,参考几种现有培养基的组成,试验以酪蛋白胨、酵母浸膏粉和牛肉浸膏为复合氮源,分别做不同配比的培养试验,结果见表 2。

[0041] 表 2. 氮源配比试验结果

[0042]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8
酪蛋白胨 (%)	0.5	1.0	1.0	2.0	0.5	1.0	1.0	2.0
酵母粉 (%)	0.5	0.5	1.0	2.0	0.5	0.5	1.0	2.0
牛肉浸膏 (%)	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5
24hr 菌浓cfu/ml $\times10^8$	3.9	3.8	4.0	3.8	5.5	7.5	6.5	5.0

[0043] 结果表明氮源组成和比例对菌数有明显影响,其中 6、7 组的培养结果较好。

[0044] ③碳氮综合试验 :结合以上两个试验结果,进行不同碳氮比下菌体得率和芽孢生成率的试验。结果见表 3。

[0045] 表 3. 碳氮综合试验结果

[0046]

试验组	1	2	3	4	5	6
葡萄糖 (%)	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5
酪蛋白胨 (%)	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0
酵母粉 (%)	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	1.0
牛肉浸膏 (%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
芽孢转化率 (%)	90	95	95	80	80	85
24hr 菌浓 cfu/ml×10 <sup>8</sup>	5.5	7.5	6.5	5.0	5.5	6.0

[0047] 结果表明 2 组菌数和芽孢转化率较高。

[0048] 综合以上试验结果, 兼顾菌量和芽孢率, 最终确定碳氮源配比 : 葡萄糖 1.0%、酪蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%、牛肉浸膏 0.5%。

[0049] (2) 无机盐及微量元素的配比研究

[0050] 根据酪酸梭菌营养利用特性, 分别做了几组不同无机盐及微量元素配比的培养试验, 试验中采用 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为无机氮源 ; 用 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 作为缓冲物及 K<sup>+</sup> 来源 ; 添加 MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 试验结果见表 4。

[0051] 表 4. 无机盐及微量元素配比试验结果

[0052]

试验组	1	2	3	4	5	6
NaCl (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
MgSO <sub>4</sub> (%)	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.05
MnSO <sub>4</sub> (%)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
CaCO <sub>3</sub> (%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
芽孢转化率 (%)	83	86	85	90	95	90

[0053] 结果表明无机盐及微量元素的配比与芽孢形成有密切的关系, 尤其是 Mg<sup>2+</sup> 对芽孢转化率的提高有显著的作用。其中第 5 组的培养结果较理想, 按此可确定无机盐及微量元素的配比。

[0054] (3) 添加抗氧化剂对菌体生长影响的研究

[0055] 本实验用 Vc 和半胱氨酸作为抗氧化剂加入培养基, 与空白组做培养对比试验, 结果见表 5。

[0056] 表 5. 厌氧试验

[0057]	试验组	添加	空白
	半胱氨酸 (%)	0.01	0
	Vc (%)	0.1	0
	24hr 菌浓 cfu/ml	$7.0\times10^8$	$7.0\times10^8$

[0058] 从表 5 结果可以看出,抗氧化剂添加与否对培养结果并无明显影响,而抗氧化剂灭菌时易失活,且会影响培养基 pH。因此培养基中可不必添加抗氧化剂。综合以上试验结果,最终确定培养基配方,见表 6。

[0059] 表 6. 酪酸菌培养基配方

[0060]	培养基成分	用量 (%)	备 注
	葡萄糖	1.0	
	酪蛋白胨	1.0	
	酵母粉	0.5	
	牛肉浸膏	0.5	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3	
	NaCl	0.3	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.02	单 溶
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05	单 溶
	CaCO <sub>3</sub>	0.2	
	琼脂	2.0	固体培养基使用

[0061] pH = 7.0 灭菌条件 :121℃ 20min。

[0062] (4) 接种 pH

[0063] 本实验以几种不同的接种 pH 进行接种培养,培养结果见表 7。

[0064] 表 7. 接种 pH 试验

[0065]	试验组	1	2	3	4	5	6	7
	接种 pH	6.0	6.5	6.8	7.0	7.2	7.5	8.0
	菌体形态	较细弱	较细弱	较粗壮	较粗壮	较粗壮	较细弱	较细弱
	24hr 菌浓 cfu/ml	$5.0\times10^6$	$6.0\times10^7$	$6.8\times10^8$	$7.5\times10^8$	$7.0\times10^8$	$8.0\times10^7$	$5.5\times10^6$

[0066]								
--------	--	--	--	--	--	--	--	--

[0067] 结果表明酪酸梭菌适宜接种 pH 为中性,确定 pH7.0 为最佳接种条件。

[0068] (5) 热处理方法研究

[0069] 酪酸梭菌为内生芽孢菌,此类菌的优选及复壮一般都可采用热处理的方法。据此本实验在菌种转接时进行热处理。具体操作为培养基升温至 80℃接种,接种后于 80℃保持 10 分钟,然后冷却至培养温度继续培养,通过此步处理可起到优化菌种、激活芽孢促使其尽快萌发、促成同步培养以及进一步防止污染等效果。以下为热处理组与常温接种组连续转接 3 次后的对照实验结果。

[0070] 表 8. 热处理对照实验结果

[0071]

试验组	热处理组	常温接种组
萌发速度	5 分钟内萌发率为 100%	完全萌发需 30 分钟以上
芽孢转化情况	培养 12 小时生芽孢, 16 小时转化率为 80%	培养 14 小时生芽孢, 16 小时转化率为 60%
耐热及稳定性	100℃加热 1 分钟存活率为 85%以 上, 菌粉于 37℃保 存半年, 存活率为 90%	100℃加热 1 分钟存活率 为 75%, 菌粉于 37℃保 存半年, 存活率为 85%

[0072] (6) 培养温度研究

[0073] 酪酸梭菌适宜培养温度为 32-40℃,本实验分别取不同温度进行培养,24hr 培养结果见表 9。

[0074] 表 9. 培养温度试验

[0075]	试验组	1	2	3	4	5	6	7	8
	温度℃	25	32	35	36	37	38	40	45
	cfu/ml	$2.0\times10^5$	$2.5\times10^8$	$6.5\times10^8$	$7.5\times10^8$	$7.5\times10^8$	$7.0\times10^8$	$6.6\times10^7$	$3.5\times10^6$
	转化率(%)	/	85	90	95	90	80	65	/

[0076] 根据表 9 结果,可确定最适培养温度为 36℃。

[0077] (7) 培养时间研究

[0078] 培养时间是影响菌浓及芽孢成熟率的重要因素,本实验取不同培养时间进行培养,结果见表 10。

[0079] 表 10. 培养时间试验

[0080]	试验组	1	2	3	4	5	6
	培养时间 (hr)	16	20	24	30	36	48
	菌浓 cfu/ml	$7.0\times10^8$	$7.5\times10^8$	$7.5\times10^8$	$7.0\times10^8$	$6.8\times10^8$	$5.0\times10^8$
	芽孢转化率 (%)	80	90	95	95	95	/
	芽孢成熟率 (%)	70	85	95	95	95	/



[0081] 结果表明培养时间短菌数高,但芽孢转化率及成熟度均较低;时间过长芽孢转化率及成熟度并无提高,反而出现菌体老化、菌数下降的情况。试验结果表明 24hr 为最适培养时间。

[0082] 实施例 3 酪酸梭菌的耐受性实验

[0083] 1、实验材料

[0084] 菌种:酪酸梭菌 CGMCC No. 1925;嗜酸乳杆菌,北京市真菌工程实验室提供;

[0085] 胆汁:动物胆汁,中国农业科学院畜牧研究所提供;

[0086] 培养基:酪酸梭菌和嗜酸乳杆菌培养,均使用 MRS 培养基;MRS 培养基配方:葡萄糖 2%、酪蛋白胨 0.5%、酵母粉 0.3%、牛肉膏 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%、NaCl 0.2%、 $\text{K}_2\text{HSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2%、 $\text{KH}_2\text{SO}_4$  0.2%、 $\text{CaCO}_3$  0.5%、琼脂 2.0% (固体培养基用)、pH 值:7.2,灭菌条件:121℃ 30 分钟。

[0087] 2、实验方法

[0088] 2.1 酪酸梭菌培养基接种后培养 24 小时,芽孢生成率 $\geq 85\%$ ,离心分离,使用蒸馏水制成菌悬液;嗜酸乳杆菌培养基接种后培养 24 小时,离心分离,使用蒸馏水制成菌悬液;

[0089] 2.2 配制不同胆汁浓度的液体,加入 1/5 的菌悬液,使胆汁的最终浓度为 0.0、0.3、0.6、1.0%,处理 1-6 小时,用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数;

[0090] 2.3 将酪酸梭菌菌悬液用盐酸调 pH 到 1、2、3、4,处理 1-4 小时后,用 0.2M pH7.0 的无菌磷酸盐缓冲溶液将样品逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数;

[0091] 2.4 将酪酸梭菌菌粉于常温 (25℃)、80、90、100℃生理盐水中处理 5、10、15、20 分钟后,用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数。将酪酸梭菌菌粉用铝薄袋包装,放于常温 (25℃) 和 60℃保温箱中存放 10 天,于第 5、10 天,取样用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数。

[0092] 3、实验结果

[0093] 3.1 耐胆汁试验

[0094] 将酪酸梭菌和嗜酸乳杆菌的菌悬液用预先配制好的胆汁溶液处理,处理时间分别为 1、1.5、3、4.5、6 小时,用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,然后测定酪酸梭菌活菌数,以无胆汁处理的样品为 100%,计算存活率。结果见表 11。

[0095] 表 11. 酪酸梭菌耐胆汁试验

菌种	胆汁浓度 (%)	存活率 (%)				
		1hr	1.5hr	3hr	4.5hr	6hr
[0096] 酪酸梭菌	0	100	100	100	100	100
	0.3	98	98	92	94	95
	0.6	98	98	95	95	95
	1.0	95	95	95	92	94
嗜酸乳杆菌	0	100	100	100	100	100
	0.3	100	75	68	66	63
	0.6	98	68	63	60	59
	1.0	98	67	65	57	57

[0097] 结果表明胆汁处理对酪酸梭菌的活性几乎没有影响,而嗜酸乳杆菌经胆汁处理后活性有明显下降的趋势,酪酸梭菌对胆汁的耐受性很高。

[0098] 3.2 耐酸试验

[0099] 使用盐酸模拟胃酸环境,处理酪酸梭菌和嗜酸乳杆菌,不同时间测定酪酸梭菌和嗜酸乳杆菌的活性,以 pH7 样品的活菌数为 100%,计算试验样品的存活率,测定结果见表 12。

[0100] 表 12. 酪酸梭菌耐酸试验

菌种	pH	存活率 (%)				
		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr
[0101] 酪酸梭菌	1	100	98	96	87	68
	2	99	98	97	87	82
	3	100	98	98	96	94
	4	100	99	98	96	94
	7	100	100	100	100	100
[0102] 嗜酸乳杆菌	1	100	80	≤10	≤5	≤5
	2	100	95	81	75	60
	3	100	95	85	78	62
	4	100	94	94	95	95
	7	100	100	100	100	100

[0103] 结果表明,在 2 小时内,酪酸梭菌对酸不敏感,活性基本无变坏,甚至在 pH 1.0 的环境中也很稳定,但随其在酸溶液中时间的延长,在 pH 1.0、2.0 条件下活性明显降低,在

pH 3.0、4.0 条件下酪酸梭菌的活性基本不受影响。结果显示,酪酸梭菌的耐酸性能明显强于嗜酸乳杆菌。

[0104] 3.3 耐温试验

[0105] 酪酸梭菌菌粉于常温 (25℃)、80、90、100℃生理盐水中处理 5、10、15、20 分钟后,用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数,以 25℃条件的活菌数为 100%,计算存活率。结果见表 13。

[0106] 酪酸梭菌菌粉于常温 (25℃) 和 60℃温箱保存,在第 5、10 天取样,用蒸馏水逐级稀释至一定浓度,进行酪酸梭菌平板计数,以 25℃条件的活菌数为 100%,计算存活率。结果见表 14。

[0107] 表 13. 液体中耐高温试验

[0108]

处理温度 (℃)	存活率%			
	处理 5 分钟	处理 10 分钟	处理 15 分钟	处理 20 分钟
25	100	100	100	100
80	95.5	96.8	94.0	95.4
90	—	91.6	88.0	80.5
100	78.8	56.0	30.5	—

[0109] 结果表明,在高温液体中酪酸梭菌具有一定的耐受能力,但在 100℃条件下存活率降低较快,饲料加工过程只是瞬间达到高温,因此判断酪酸梭菌具有耐受饲料加工的瞬间热破坏的能力。同样条件下嗜酸乳杆菌全部灭活。

[0110] 表 14. 耐高温保存试验

[0111]

试验温度 (℃)	25		60	
试验时间 (天)	5	10	5	10
存活率 (%)	100	100	92	90

[0112] 结果表明酪酸梭菌具有较好的热存放稳定性。

[0113] 实施例 4 酪酸梭菌的抗性

[0114] 1、材料与方法

[0115] 1.1 菌种 :酪酸梭菌 CGMCC No. 1925

[0116] 1.2 培养基 :MRS 培养基

[0117] 1.3 不锈钢小管 :内径 6mm、高 10mm、外径 7.8mm。

[0118] 1.4 抗菌素 :

[0119] (1) 卡那霉素 :含量 98%,北京百林康源生物技术有限责任公司提供。

[0120] (2) 杆菌肽锌 :含量 15%,天津新兴兽药厂提供。

[0121] (3) 黄霉素 :含量 5%,北京大北农饲料科技公司提供。

[0122] (4) 硫酸粘杆菌素 :含量 15%，天津新兴兽药厂提供。

[0123] (5) 诺氟沙星 :含量 95%，北京都德伟业饲料公司提供。

[0124] 1.5 方法

[0125] (1) 菌悬液配置 :取酪酸梭菌接种于 250ml 灭菌的 MRS 培养中,37℃培养 24 小时,计数后,用无菌水稀释至浓度为  $1\times 10^7$  个菌 /ml 的菌悬液,作为接种液。

[0126] (2) 双碟的制备 :将 20ml 灭菌后的 MRS 固体培养基融化后加入培养皿中,冷却制作第一层培养基。然后去融化的 MRS 培养基 5ml 和菌悬液 1ml,于 50-60℃加入培养皿中,摇匀后冷却制作第二层培养基 (作为菌层)。

[0127] (3) 检测 :采用三剂量法,在每个培养皿中放入 6 个不锈钢小管,其中一组间隔的 3 个管中滴加高、中、低浓度的参照抗菌素溶液。另外 3 管加入稀释至一定浓度的试验高、中、低浓度样品 (使用饲料用抗菌素推荐用量),使用卡那霉素作为参照抗菌素。试验用抗菌素溶液配置见表 15。

[0128] 表 15. 抗菌素样品配置表

[0129]	编号	抗菌素名称	样品浓度 (%)	试验高低度 (ppm)	试验中浓度 (ppm)	试验高浓度 (ppm)
	1	卡那霉素	98	100	150	200
	2	杆菌肽锌	15	10	20	40
	3	黄霉素	5	2	3	5
	4	硫酸粘杆菌素	15	10	20	40
	5	诺氟沙星	95	50	75	100

[0130] 2、试验结果

[0131] 将按表 15 配制的抗菌素溶液滴加到培养皿的钢管中,于 37℃,厌氧罐中培养 24 小时后,观察抑菌圈大小,同参照抗菌素相同或接近的判断为敏感。研究结果表明,酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 对硫酸粘杆菌素不敏感,对诺氟沙星敏感性弱。

[0132] 实施例 5 微生态制剂的制备

[0133] (1) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的菌种复壮 ;

[0134] 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的菌种接种于 250mlMRS 培养基 (500ml 三角瓶) 中,于 37℃恒温箱中培养 24 小时,按此条件依次接种 5 代 (接种量为 10%)。实验结果如表 16。

[0135] 表 16. 酪酸梭菌传代试验

[0136]	代数	芽孢率%	血球计数 (个/ml)	活菌数 (CFU/ml)
	1	50%	$5.24 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$
	2	70%	$3.68 \times 10^8$	$2.9 \times 10^7$
	3	85%以上	$5.4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^7$
	4	85%以上	$4.5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^7$
	5	80%以上	$3.8 \times 10^8$	$3.8 \times 10^7$

[0137] 由上表可知第 4 代发酵液芽孢率高且平板记数较高,但发酵参数无很大差距,传代过程中,选第四代进行平板分离,挑取单菌落制作试管斜面,并将其保存在 4℃冰箱中。

[0138] (2) 酪酸梭菌 CGMCC No. 1925 的培养、发酵 :将复壮菌种接种于 CBM 液体培养基中,37℃恒温箱中培养 24 小时,芽孢率在 75%以上后,接种于发酵罐中,接种量 10%,37℃恒温培养 24 小时,芽孢率达到 75%以上时,使发酵液降温至 20℃ ;

[0139] (3) 连续离心收集菌体,将菌泥用 10%脱脂奶和玉米芯粉调配至固型物浓度 10%,以进口温度 115℃,出口温度 80℃的条件进行喷雾干燥,收集菌粉或风干收集菌粉 ;

[0140] CBM 培养基配方 :葡萄糖 1.0%、酪蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%、牛肉膏 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%、NaCl 0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.4%、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{CaCO}_3$ 0.2%、琼脂 2.0% ( 固体培养基用 ),pH 值 :7.2,灭菌条件 :121℃,30 分钟。结果见表 17

[0141] 表 17. 微生态制剂检测结果 ( 离心风干分离 )

[0142]	编号	血球计数 (个/ml)	平板计数 (cfu/ml)	芽孢率 (%)	干菌粉重量 (kg)	菌粉检测值 (cfu/g)
	1	$8.5 \times 10^8$	$3.48 \times 10^7$	84	1700	$4.3 \times 10^8$
	2	$7.5 \times 10^8$	$3.51 \times 10^7$	87	1900	$3.9 \times 10^7$
	3	$7.0 \times 10^8$	$3.20 \times 10^7$	85	2350	$2.3 \times 10^9$
	4	$8.6 \times 10^8$	$3.68 \times 10^7$	90	2280	$2.9 \times 10^8$
	5	$7.8 \times 10^8$	$2.82 \times 10^7$	80	2970	$1.7 \times 10^7$
	6	$7.9 \times 10^8$	$3.44 \times 10^7$	85	2600	$2.6 \times 10^8$

[0143] 表 18. 微生态制剂检测结果 ( 喷雾干燥 )

[0144]	编 号	血球计数 (个/ml)	平板计数 (cfu/ml)	喷雾物料浓度 (%)	发酵液体积 (ml)	菌粉重量 (g)	活菌数 (cfu/g)
	1	8.5*10 <sup>10</sup>	3.48×10 <sup>9</sup>	10	5000	450	4.8×10 <sup>10</sup>
	2	7.5*10 <sup>9</sup>	3.51×10 <sup>8</sup>	10	5000	500	3.6×10 <sup>9</sup>
	3	7.0*10 <sup>9</sup>	3.20×10 <sup>8</sup>	5	5000	350	7.8×10 <sup>9</sup>
	4	8.6*10 <sup>8</sup>	3.68×10 <sup>7</sup>	5	5000	340	6.8×10 <sup>8</sup>

[0145] 结果表明喷雾干燥方式制备的菌粉比气流干燥制备的菌粉菌含量高,所得菌粉用铝箔袋封口,保存于 4℃冰箱中。

[0146] 实施例 6 微生态制剂的稳定性试验

[0147] 一、材料与方法

[0148] 1、实施例 5 喷雾干燥制备的微生态制剂,菌浓度 7.4×10<sup>9</sup>cfu/g

[0149] 2. 培养基 :葡萄糖 15g,酪蛋白胨 5g,酵母浸膏 5g,氯化钠 2g,磷酸氢二钾 2g,磷酸二氢钾 2g,硫酸铵 2g,琼脂 20g,蒸馏水 1000ml, pH 7.2。将上述培养基分装后高压灭菌 121℃ 20-30 分钟。

[0150] 3. 取样稀释 :以无菌操作取样品 1g,放入装有 99ml 灭菌液体培养基和适量玻璃珠的三角瓶中,放于 37℃恒温箱中活化 1 小时,用机械振荡器振荡 30 分钟制成 1 : 100 的样品均液。用 1ml 无菌吸管,吸取 1 : 100 样品均液 1ml,沿管壁注入含有 9ml 无菌水生理水的试管中。另取 1ml 无菌吸管,按上述操作顺序,作 10 倍递增稀释液。如此每递增一支,更换 1 支 1ml 无菌吸管。

[0151] 4. 培养条件 :选择合适的三个连续稀释度样品液进行平板计数。每个稀释度作 6 个平皿,在平皿上作上标记。每个平皿中加入 12-15ml 已融化并冷却至 45-50℃的 MRS 培养基,待培养基冷却且表面干燥后,用无菌吸管吸取相应梯度的混合稀释液 0.1ml 加入平皿中,并立即用涂布器均匀涂布在冷却培养基表面。以上整个操作应自培养物加入培养皿开始至接种结束须在 20 分钟内完成。如果某一样品液在取出供试部分前的放置时间超过 2 分钟,应用机械振荡器振荡 15 秒。待稀释液完全渗入培养基内后,将平板翻转,置于厌氧菌培养罐中于 37±1℃温箱内培养 24-48 小时取出。

[0152] 5. 厌氧培养 :

[0153] (1) 利用氢硼化钠或氢硼化钾与水反应产生氢气,在钯的催化下,氢气与袋内的氧气结合生成水,从而建立起无氧环境。

[0154] (2) 在无氧环境下加入 10%左右的二氧化碳,有利于厌氧菌的生长。二氧化碳是由柠檬酸和碳酸氢钠反应得到的。

[0155] (3) 称取 2 克氢硼化钠或氢硼化钾,1 克柠檬酸和 1 克碳酸氢钠,用适当大小的滤纸包好,并装在三面密封的小塑料袋中。将干燥剂在电炉上烘烤 5 分钟左右,安装在厌氧菌培养罐的盖子下面。

[0156] (4) 将准备好的平板倒置于铝制的小架子里,放在厌氧罐中,将装有药品的小塑料袋放在小架子旁边。

[0157] (5) 将厌氧菌培养罐的盖子盖好,把盖子上的小口打开,用吸管吸取 10ml 左右的

蒸馏水,通过小口加入到药品包上,尽快撤出吸管,并把口拧紧。

[0158] (6) 待药品反应完全,且罐无漏气现象,将罐置于 37±1℃温箱中培养。

[0159]

有益菌活菌数 (CFU/g)= $\frac{\text{菌落均值}\times\text{稀释液倍数}}{0.1}$

[0160] 6. 计数：

[0161] 7. 样品试验：

[0162] (1) 制剂存放试验：将实施例 6 喷雾干燥制备的微生物制剂分装于铝薄袋中,分别存放于 25℃、40℃温度的保温箱中,于不同时间测定样品中的菌数。

[0163] (2) 制剂在饲料中的稳定性试验：将实施例 6 喷雾干燥制备的微生物制剂按 1% 的添加量添加于饲料中,进行冷造粒,颗粒料分装于塑料袋中,存放于室温 (20-30℃),于不同时间取样测定饲料中的酪酸梭菌活菌数量。

[0164] 二. 试验结果

[0165] 1. 制剂存放试验

[0166] (1) 25℃存放试验,见表 19。

[0167] 表 19 25℃存放试验结果

[0168]	产品	贮存条件	放置时间 (月)	外观	活菌数 (CFU/g)
	实施例 5 喷雾干燥制备的微生物制剂	25℃	0	无变化	7.4×10 <sup>9</sup>
			1	无变化	7.0×10 <sup>9</sup>
			2	无变化	6.8×10 <sup>9</sup>
			3	无变化	6.7×10 <sup>9</sup>
			6	无变化	6.8×10 <sup>9</sup>
			12	无变化	6.8×10 <sup>9</sup>

[0169] (2) 40℃存放试验,见表 20。

[0170] 表 20 40℃存放试验结果

[0171]	产品	贮存条件	放置时间 (月)	外观	活菌数 (CFU/g)
	实施例 5 喷雾干燥制备的微生物制剂	40℃	0	无变化	7.4×10 <sup>9</sup>
			1	无变化	6.5×10 <sup>9</sup>
			2	无变化	6.2×10 <sup>9</sup>
			3	无变化	6.2×10 <sup>9</sup>
			6	无变化	6.0×10 <sup>9</sup>
			12	无变化	6.2×10 <sup>9</sup>

[0172] 2. 本发明的微生物制剂在饲料中的稳定性试验,见表 21。

[0173] 表 21 本发明的微生物制剂在饲料中的稳定性试验

[0174]	产品	试验项目	活菌数 (CFU/g)
	实施例5喷雾干燥制备的微生物生态制剂	造粒前饲料样品	$3.2 \times 10^7$
		造粒饲料样品	$3.4 \times 10^7$
		造粒饲料样品 (存放 1 天)	$3.6 \times 10^7$
		造粒饲料样品 (存放 7 天)	$3.0 \times 10^7$
		造粒饲料样品 (存放 30 天)	$1.7 \times 10^7$
		造粒饲料样品 (存放 90 天)	$8.8 \times 10^5$

[0175] 试验结果表明,本发明实施例 5 制备的微生物生态制剂在 25℃、40℃温度的保存条件下活性基本稳定,随存放时间的延长,活性略有下降,但在试验期内活性损失不大。

[0176] 实施例 7 酪酸梭菌替代肉鸡饲料抗生素的应用效果实验

[0177] 1 材料与方法

[0178] 1.1 试验材料

[0179] 实施例 5 喷雾干燥制备的微生物生态制剂,即微生物生态制剂,活菌数  $7.4 \times 10^9$ CFU/g。

[0180] 1.2 试验动物及分组

[0181] 试验地点 :试验在山东寿光鸡场

[0182] 试验时间 :42 天

[0183] 选取 10 日龄健康的 AA 肉鸡 ( 公母混合 )1200 只,随机分布到 10 个处理组,每个处理 3 个重复,每个重复 40 只。饲养时间为 42 天。试验分组情况见表 22。

[0184] 表 22 试验动物分组及分组

[0185]	组别	日粮
	空白对照组	基础日粮
	抗生素对照组	基础日粮+黄霉素
	试验组 1	基础日粮+微生物生态制剂 500g
	试验组 2	基础日粮+微生物生态制剂 1000g
	试验组 3	基础日粮+微生物生态制剂 2000g
	试验组 4	基础日粮+微生物生态制剂 3000g

[0186] 1.3 日粮配制

[0187] 参照 NRC(1994) 肉鸡营养需要标准和本试验鸡场的饲养标准进行日粮设计和配制。基础日粮配方见表 23。

[0188] 表 23 试验基础日粮组成



[0189]

原料	0-21d	22-35d	36-42d
玉米	56	56	57
豆粕	20.4	13.8	8.4
小麦	5	10	15
棉粕	3	5	5
菜粕	2	4	3
花生粕	2	-	
棉籽蛋白	2.5	-	
玉米蛋白粉	3	4	4
磷酸氢钙	1.5	1.5	1.4
石粉	1.4	1.4	1.4
油脂	1.2	2.3	2.8
预混料	2	2	2
合计	100	100	100
营养指标			
粗蛋白，%	20.5	18.8	16.8
代谢能，kcal/kg	2890	2982	3050
蛋氨酸	0.48	0.42	0.38
赖氨酸	1.15	1.00	.090
钙	1.02	0.91	0.86
有效磷	0.45	0.40	0.38

[0190] 1.4 饲养管理

[0191] 按照本试验鸡场的常规管理程序进行免疫和日常管理,采用地面平养垫料方式进行饲养,自由采食和饮水,每天投料两次,即上午 9 点和下午 4 点。在 10、22 和 43 日龄以重复为单位进行空腹称重,每天仔细观察和记录鸡只的健康状况和粪便情况,以重复为单位记录每天的投料量。

[0192] 1.5 检测指标

[0193] 平均日采食量、平均日增重、料重比、腹泻率和成活率

[0194] 1.6 数据分析

[0195] 采用 SPSS13.0 软件进行数据统计分析。

[0196] 2 结果与分析

[0197] 2.1 不同益生菌处理组对 10-21 日龄生产性能比较

[0198] 表 24 10-21 日龄生产性能比较

[0199]

组别	10d 均重,g	21d 均重,g	10-21d(g/d) 平均日增重	10-21d(FCR) 耗料/增重
空白对照组	171.17±0.63 <sup>a</sup>	632.86±7.88 <sup>a</sup>	46.17±0.75 <sup>ac</sup>	1.65±0.03 <sup>ab</sup>
抗生素组	168.18±2.93 <sup>a</sup>	618.33±9.02 <sup>ab</sup>	45.02±0.68 <sup>abc</sup>	1.66±0.03 <sup>ab</sup>
试验组 1	171.07±0.92 <sup>a</sup>	612.08±14.90 <sup>ab</sup>	44.10±1.35 <sup>b</sup>	1.70±0.05 <sup>a</sup>
试验组 2	169.2±0.53 <sup>a</sup>	610.42±6.55 <sup>b</sup>	44.12±0.70 <sup>b</sup>	1.70±0.03 <sup>a</sup>
试验组 3	170.14±0.58 <sup>a</sup>	632.36±0.60 <sup>ac</sup>	46.22±0.08 <sup>ac</sup>	1.63±0.02 <sup>ab</sup>
试验组 4	168.02±0.61 <sup>a</sup>	623.75±3.61 <sup>ab</sup>	45.57±0.40 <sup>abc</sup>	1.64±0.01 <sup>ab</sup>

[0200] 备注 :表格中同一列不同字母代表差异显著 ( $p \leq 0.05$ ), 字母相同者代表差异不显著 ( $p \geq 0.05$ ), 以下表同。

[0201] 从表 24 结果得知,21d 平均个体重 :添加酪酸梭菌的试验组,添加量 0.2% 组最高,比抗生素对照组提高 2.27%。

[0202] 10-21d 平均日增重 :酪酸梭菌组以 0.2% 添加剂最高,显著高于 0.05% 和 0.1% 添加组 ( $p \leq 0.05$ ),酪酸梭菌各处理组与两个对照组差异都不显著 ( $p \leq 0.05$ );各处理组以添加酪酸梭菌 0.2% 组最高。

[0203] 10-21d 料重比 :酪酸梭菌组以 0.2% 添加剂最低,但各组间差异不显著 ( $p \geq 0.05$ )。

[0204] 2.2 10-42 日龄不同益生菌处理生产性能比较

[0205] 表 25 10-42 日龄生产性能比较

[0206]

组别	42d 均重 g	10-42d(g/d)平 均日增重	10-42d(FCR) 耗料/增重	10-42d 死淘率, %
空白对照组	1861.70±24.29 <sup>a</sup>	80.50±1.19 <sup>a</sup>	2.18±0.03 <sup>a</sup>	1.67
抗生素组	1822.88±35.36 <sup>a</sup>	78.80±1.55 <sup>a</sup>	2.16±0.03 <sup>a</sup>	0.83
试验组 1	1858.70±41.39 <sup>a</sup>	80.36±1.80 <sup>a</sup>	2.14±0.04 <sup>a</sup>	0.83
试验组 2	1790.67±20.46 <sup>a</sup>	77.21±0.95 <sup>a</sup>	2.19±0.03 <sup>a</sup>	0.83
试验组 3	1818.43±49.69 <sup>a</sup>	78.49±2.37 <sup>a</sup>	2.16±0.07 <sup>a</sup>	0.86
试验组 4	1819.09±22.63 <sup>a</sup>	78.62±1.05 <sup>a</sup>	2.13±0.08 <sup>a</sup>	0.83

[0207]

[0208] 从表 25 结果可以看出,10-42d 平均日增重和料重比及 42d 平均个体重各组间都差异不显著。酪酸梭菌组的 42d 平均个体重和 10-42d 平均日增重以低剂量的 0.05% 添加组最好,且分别比抗生素对照组提高了 1.97%。

[0209] 3 结论

[0210] 本试验结果表明,在肉鸡生长前期添加 0.2%酪酸梭菌替代抗生素的综合效果较好;生长后期酪酸梭菌以低剂量的 0.05%添加效果较好,添加本发明微生态制剂组死淘率显著降低,与添加黄霉素组死淘率相当,说明本发明的微生态制剂与黄霉素具有同等的抑菌作用,可替代黄霉素预防动物的疾病发生。