

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A23K 1/16 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510031925.3

[43] 公开日 2007 年 1 月 31 日

[11] 公开号 CN 1903058A

[22] 申请日 2005.7.27
[21] 申请号 200510031925.3
[71] 申请人 湖南中业科技发展有限公司
地址 410125 湖南省长沙市芙蓉区马坡岭农
科院植保所
[72] 发明人 罗赫荣 龚章霞 张秋胜 梁志怀

[74] 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公
司
代理人 马 强

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称
畜禽用三元活性微生态制剂

[57] 摘要
一种用作饲料添加剂的畜禽用三元活性微生态制剂，其重量份组成是：活菌制剂 94% - 98%、低聚寡糖 0.1% - 1%、卵黄免疫球蛋白 1% - 5%；所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1 : 0.9 - 1.1 : 0.9 - 1.1 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。本发明充分发挥了抗体球蛋白的特异性免疫功能和活菌剂、低聚寡糖的非特异性免疫功能，提高了制剂的针对性；还使活菌处于休眠状态，提高了制剂的稳定性；并采用微胶囊包埋技术，延长了制剂的货架期。

1、一种畜禽用三元活性微生态制剂，其特征是，它的重量份组成是：

活菌制剂 94 % — 98 % ；

低聚寡糖 0.1 % — 1 % ；

卵黄免疫球蛋白 1 % — 5 % ；

其中，所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1：0.9 — 1.1：0.9 — 1.1 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。

2、根据权利要求 1 所述的畜禽用三元活性微生态制剂，其特征是，以所述成份为芯材，以下述重量份成分的均匀混合物为壁材：

变性淀粉 35 % — 45 % ；

阿拉伯胶 10 % — 20 % ；

麦芽糊精 20 % — 30 % ；

玉米糖浆 15 % — 25 % ；

将上述芯材与壁材按 1：0.9 — 1.1 之重量比混合均质后，经常规低温喷雾工艺制成微胶囊状态产品。

3、根据权利要求 1 所述的畜禽用三元活性微生态制剂，其特征是，所述低聚寡糖为低聚木糖、低聚果糖、低聚甘露中的一种。

畜禽用三元活性微生态制剂

技术领域

本发明涉及畜禽用饲料添加剂, 进一步是指用做所述添加剂的畜禽用三元活性微生态制剂。

背景技术

抗生素在畜禽养殖业的应用, 为世界畜牧业的发展做出了巨大的贡献, 然而也带来了极大的隐患: 第一, 引起内源性感染和二重感染; 第二, 使畜禽机体免疫力下降, 细胞产生耐药性, 并通过质粒发生传递, 可转移到人体, 威胁人类身体健康; 第三, 化学残留会污染肉、蛋、奶, 降低畜禽产品的质量。因此, 世界发达国家已于 1989 年开始全面禁止抗生素在饲料中的应用。

为了克服抗生素的各种弊端, 世界各国先后开展了无毒副作用、无残留的绿色饲料添加剂的研究, 而在其研究与开发过程中, 首选研究的是微生态制剂。微生态制剂是一种含有大量有益菌及其代谢产物和生长促进因子, 并且有维持肠道微生态平衡、提高机体健康水平的活菌制剂。免疫球蛋白是动物机体产生的抗感染物质, 近年来, 国外研究证明, 在日粮中添加多克隆抗体, 可以预防仔猪和牛犊的大肠杆菌腹泻症。美国食品和药品管理局于 1996 年将卵黄免疫球蛋白(Igy)列入“一般公认安全物质”范畴, 德国于 1995 年批准将其用于饲料添加剂。

微生态制剂这种新型的生物产品, 虽然正在以其独特的功能影响日益发展的畜牧业, 但还存在许多有待进一步研究问题: 第一, 针对性不强, 不如抗生

素那样可针对某种肠道疾病而采用相应的产品,针对性很强地进行治疗;第二,微生态制剂菌株的稳定性不高,如活菌剂的抗热性、耐酸性等抵抗外界不良环境的能力低;第三,微生态制剂产品的货架期不长,随着贮存期的增加,活菌数量逐步降低。

从国外开发和使用效果看,复合菌制剂较单一菌剂作用效果更好,复合菌制剂一般都具有协同作用。为了提高微生态制剂的有效性,人们正着力于微生态制剂辅助剂的研制与开发。如对低聚寡糖与活菌制剂复合添加的试验,取得一定效果;同时也在开发和研究活菌剂与其他制剂间的联合作用。目前国外还在研究通过基因工程技术,把一些有用的外源基因导入活菌制剂的菌种中,扩大其生物学特殊功能,从而达到一种制剂多种功能的目的。

发明内容

本发明要解决的技术问题是,针对现有技术存在的不足,提出一种畜禽用三元活性微生态制剂,它将活菌制剂、低聚寡糖、抗体球蛋白有机地结合起来,以充分发挥抗体球蛋白的特异性免疫功能和活菌剂、低聚寡糖的非特异性免疫功能,以提高了微生态制剂的针对性;还可采用低温真空冷冻干燥技术,将活菌剂制成干粉,使活菌处于休眠状态,以提高微生态制剂的稳定性;还可采用微胶囊包埋技术,将三元活性制剂包埋起来,以延长微生态制剂的货架期。

本发明的技术解决方案是,所述畜禽用三元活性微生态制剂的重量份组成是:

活菌制剂	94 % — 98 % ;
低聚寡糖	0.1 % — 1 % ;
卵黄免疫球蛋白	1 % — 5 % ;

其中，所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1: 0.9 — 1.1: 0.9 — 1.1 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。

以下对本发明做出进一步说明。

所述低聚寡糖可以是低聚木糖、低聚果糖、低聚甘露中的一种，也可以是其它低聚寡糖。

本发明可以上述三元活性微生物制剂的有效成份为芯材，以下述重量份成分的均匀混合物为壁材：

变性淀粉 35 % — 45 % ；

阿拉伯胶 10 % — 20 % ；

麦芽糊精 20 % — 30 % ；

玉米糖浆 15 % — 25 % ；

将上述芯材与壁材按 1: 0.9 — 1.1 之重量比混合均质后，经常规低温喷雾工艺制成微胶囊状态产品。

本发明中，所述活菌制剂可采用如下重量份组分的培养基：

主体碳源 5 % — 9 % ； 葡萄糖 1 % — 3 % ；

蛋白胨 0.4 — 0.6 % ； 植物油 0.2 — 0.4 % ；

K_2HPO_4 0.1 — 0.3 % ； $CaCO_3$ 1 % — 3 % ；

$MgSO_4$ 0.05 — 0.07 % ； $MnSO_4$ 0.02 — 0.03 % ；

水 84 % — 90 % ；

其中，所述主体碳源为土豆粉、大豆粉、玉米粉中的一种，并植入相应菌种，

每克菌液中的菌种含量是：植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个、酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个、芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。

本发明中，猪用三元活性微生态制剂主体碳源可采用土豆粉，鸡用三元活性微生态制剂主体碳源可采用大豆粉，反刍动物三元活性微生态制剂主体碳源可采用玉米粉。

本发明对所述植物乳杆菌（PC0586-2）、枯草芽孢杆菌（BL0067）、产朊假丝酵母菌（2.120）进行了单一菌株培养温度、培养时间、培养初始 PH 值、需氧量、培养基组成等生产工艺参数进行了研究，并且对它们的复合培养进行工艺参数的修正。结果表明：三种菌达到产量最高值的时间是 48-54 小时，酵母菌的发酵最适温度为 32℃，芽孢杆菌为 38℃，乳酸菌为 36℃，最适温度各不相同，因此，复合培养时，分两阶段进行，第一阶段温度 32℃，第二阶段温度 31℃，时间各半（28 小时）。三种菌的最初培养 PH 值分别为乳酸菌 5.6，酵母菌 5.8，芽孢杆菌 6.0。因此，复合发酵时 PH 值要控制在 6.0 左右。三种菌发酵过程的需氧量各不相同，乳酸菌是以厌氧呼吸为主的兼性菌，酵母菌和芽孢杆菌是好氧呼吸的菌种。因此，复合培养分两步进行，第一阶段（前 28 小时）培养时，通气 1 小时停 2 小时，第二阶段通气 2 小时停 1 小时。

本发明中，所述植物乳杆菌、酵母菌、芽孢杆菌可采用标准菌株，也可通过以下菌种分离筛选获得：

取畜禽肠道或土壤样品，稀释后通过富集驯化培养、选择培养、平板（划线）分离培养、菌落采集、纯化继代分离培养、生产试验培养、定性定量分析等步骤，从 126 份猪肠、鸡肠、牛瘤胃样品，近 2 万株菌株中，分离筛选出一株高产乳酸的植物乳杆菌（暂编号为 PC0586）乳酸产量 90.7g/L，比标准菌株

（中国科学院微生物菌种保存中心提供，乳酸产量为 78g/L）乳酸产量高 16%。从 27 份土壤样品，近 4000 株菌株中，分离筛选出一株抑菌能力很强的枯草芽孢杆菌变异株，暂编号为 BL0067。与标准菌株（中国科学院微生物菌种保存中心提供）比较，抑菌能力提高 31%。

本发明还可采用紫外对上述育出的植物乳杆菌 PC0586 进行诱变处理，处理剂量为成活率 1%以下。紫外线波长为 260nm 左右，紫外灯功率为 15W，距离固定在样品 30nm 高处。诱变时间 0-72h。从 2000 余份材料中，选育出一株高产乳酸的植物乳杆菌，乳酸产量达到了 130g/L，对糖的转化率为 86%-90%，而且表现较好的遗传稳定性。该菌株暂定名为 PC0586-1。

本发明还可用基因工程对所述菌种进行遗传改良。其中，转体：高产赖氨酸的棒杆菌（AS1.536）由中国科学院微生物研究所菌种保存中心提供，各种 DNA 的内切酶、赖氨酸合成途径中的关键酶基因：二氢吡啶二羧酸合成酶基因（dapA）由湖南农业科学院生物研究室提供；受体：可采用诱变育种选育出的植物乳杆菌 PC0586-1。载体：大肠杆菌。利用重组 DNA 的基因工程技术将棒杆菌（AS1.563）赖氨酸合成途径中的关键酶基因—二氢吡啶二羧酸合成酶基因（dapA），采用随机整合法，以大肠杆菌作为载体，成功地导入了目标菌株植物乳杆菌 PC0586-1，培养出一株基因工程菌株，暂编号为 PC0586-2。结果表明，外源质粒转化率高，能在目标菌中长期保存，且高水平表达。使无蛋白质分解酶的植物乳杆菌能合成赖氨酸，并且产量达到了 27g/L，应用到生产中，起到了既高产乳酸，又能产生赖氨酸的双重作用。

微生态制剂是近十年来研制开发的一种新型生物制剂，目前国内外大多还都是单元的活菌制剂，典型代表是日本琉球大学研究开发的“EM 原露”，已在

日本欧美和我国广泛应用。在此，本发明与“EM 原露”的各项技术指标比较如下：

1. 同源性比较：

本发明产品中的菌种来源之一为来源于畜禽肠道，制成三元活性制剂添加于饲料中，取食后再返回畜禽肠道，由于有良好的同源性，提高了微生物在禽畜肠道内的定植能力。而以“EM 原露”为代表的其他微生态制剂菌种大都来源于土壤，在畜禽肠道内的定植能力低于本发明产品。

2. 针对性的比较：

表 1：三元活性制剂（本发明）与 EM 原露针对性的比较

比较指标	三元活性制剂	EM 原露
菌种数量	3	80
抗体球蛋白	有	无
双歧因子	有	无
非特异免疫功能	有	有
特异免疫功能	有	无
适用范围	猪、鸡、反刍动物	所有动物、所有植物
针对性	强	差

从上述比较结果可以看出，“EM 原露”含有 80 个菌种，可用于动物饲料，也可作植物的生物肥料，其广普性好、针对性差；而三元活性制剂中含有针对大肠杆菌和沙门氏杆菌的抗体球蛋白，具有特异的免疫功能，针对性强。

3. 热稳定性比较

将本发明的三元活性制剂和 EM 原露采取了 70℃ 高温处理 10 分钟，结果表

明，三元活性制剂中的活菌成活率高达 88.7%，比 EM 原露（41.5%）提高了一倍多。

表 2：三元活性制剂（本发明）与 EM 原露的热称定性比较

比较指标	三元活性制剂	EM 原露
热处理前活菌数（个/g）	4.98×10^8	5.11×10^8
热处理后活菌数（个/g）	4.22×10^8	2.12×10^8
活菌成活率（%）	88.7	41.5

4. 酸稳定性比较

畜禽取食后，微生态制剂在动物的胃内被大量的胃酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶杀灭或被消化，能够达到肠道的活菌数量会大量降低。本发明进行了三元活性制剂与 EM 原露的模拟胃液试验。

模拟胃液组成：胃酸 10%、胃蛋白酶 1%、胰蛋白酶 0.1%、胰凝乳蛋白酶 0.05%、PH 值 4.0-5.0、时间 1-8h。

表 3：三元活性制剂（本发明）与 EM 原露胃酸稳定性比较

处理时间（h）	0	1	2	3	4	5	6	7	8
三元活性制剂 活菌成活率（%）	100	98.2	96.7	82.1	73.4	57.0	40.1	37.6	32
EM 原露活菌 成活率（%）	100	82.4	77.4	66.0	50.9	30.1	11.7	0	0

从表 3 可以看出，三元活性制剂抗抵胃酸的能力，远远高于 EM 原露，经模拟胃液处理 6 小时后，三元活性制剂中的活菌率还有 41.0%，比 EM 原露提高 4 倍，处理 7 小时后，EM 原露中已不存在活菌了，而三元活性制剂还有 37.6% 的活菌存活率。

5. 抑菌能力的比较

表 4：三元活性制剂与 EM 原露抑菌能力的比较

指示菌种	抑菌圈直径 (mm)	
	三元活性制剂	EM 原露
大肠杆菌	27.3	10.6
嗜酸乳杆菌	—	—
枯草芽孢杆菌	20.2	11.6
沙门氏杆菌	31.8	13.7
青春双歧杆菌	—	—

从表 4 可以看出，三元活性制剂和 EM 原露都对肠道内的有害菌表现出抑制作用，而对有益菌不表现抑制作用。从抑菌能力上比较，三元活性制剂对大肠杆菌的抑制能力（抑菌圈直径 27.3mm）是 EM 原露（抑菌圈直径 10.6）的 2.5 倍。

6. 货架期的比较

表 5：三元活性制剂与 EM 原露货架期的比较

比较项目	贮存前	1 月	3 月	5 月
三元活性制剂 活菌成活率 (%)	100	97.2	94.5	89.9
EM 原露活菌 成活率 (%)	100	93.0	78.77	61.1

从表 5 的结果可以看出，三元活性制剂经过 6 个月的货架期后，活菌成活率仍然达到了 89.8%，而 EM 原露经过 6 个月贮存后，活菌成活率只有 61.1%。三元活性制剂货架贮存能力提高了 45%。

由以上可知，本发明为畜禽用三元活性微生物制剂，它将活菌制剂、低聚寡糖、抗体球蛋白有机地结合起来，充分发挥了抗体球蛋白的特异性免疫功能和活菌剂、低聚寡糖的非特异性免疫功能，提高了微生物制剂的针对性；还采用了低温真空冷冻干燥技术，将活菌剂制成干粉，使活菌处于休眠状态，提高了微生物制剂的稳定性；还采用了微胶囊包埋技术，将三元活性制剂包埋起来，延长了微生物制剂的货架期。

具体实施方式

实施例 1：三元活性微生态制剂的重量份组成是： 主体碳源用土豆粉培养的活菌制剂 98 % 、低聚木糖 1 % 、卵黄免疫球蛋白（320 滴读/g） 1 %；其中，所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1： 1： 1 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个；以上述三元活性微生态制剂的有效成份为芯材，以下述重量份成分的均匀混合物为壁材：变性淀粉 45 % 、阿拉伯胶 20 % 、麦芽糊精 20 % 、玉米糖浆 15 % ；将上述芯材与壁材按 1： 1 之重量比混合均质后，经常规低温（-5℃）喷雾工艺制成微胶囊状态产品。产品应用：

地点：湖南省桃源县畜禽良种场

对象：28 日龄二元杂交（长×大）断奶仔猪

时间：28 天（2005 年 5 月 1 日-2005 年 5 月 28 日）

日粮组成：岳阳九鼎 SH112 型乳猪浓缩料

分组和饲养：试验组 12 头，对照组 15 头，每日喂料 2 次。

应用结果：

表 6：三元活性制剂的应用效果

比较指标	试验组（三元活性制剂）	对照组（未使用）	比较结果
平均日增重（g/头）	495.71	298.93	+196.78
平均日采食量（g/日.头）	796.07	564.4	+249.67
料肉比	1.61：1	1.83：1	-0.22
腹泻率（%）	4.2	14.3	-11.1
成活率（%）	100	83%	+17.0
增重 1kg 体重成本（元）	13.46	15.19	-1.73
增重 1kg 体重纯收入（元）	2.54	0.81	+1.73

从表 6 可以看出，试验组比对照组每日多增重 196.78 克，比对照提高了

65%，料肉比降低了 0.22，饲料转化率提高了 12.02%，腹泻率比对照降低了 3 倍，成活率提高了 20%，每增加一公斤体重，纯收入增加 1.73 元。

实施例 2：三元活性微生态制剂的重量份组成是：主体碳源用大豆粉培养的活菌制剂的重量份组成是：活菌制剂 94 %、低聚果糖 1 %、卵黄免疫球蛋白（320 滴读/g）5 %；其中，所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1：0.9：1 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。以上述三元活性微生态制剂的有效成份为芯材，以下述重量份成分的均匀混合物为壁材：变性淀粉 35 %、阿拉伯胶 10 %、麦芽糊精 30 %、玉米糖浆 25 %；将上述芯材与壁材按 1：0.9 之重量比混合均质后，经常规低温（0- -10℃）喷雾工艺制成微胶囊状态产品。

实施例 3：三元活性微生态制剂的重量份组成是：主体碳源用玉米粉培养的活菌制剂的重量份组成是：活菌制剂 96 %、低聚甘露 0.1%、卵黄免疫球蛋白 3.9 %；其中，所述活菌制剂由植物乳杆菌液、酵母菌液、芽孢杆菌液按 1：1：0.9 之重量比组成，且每克植物乳杆菌液中含植物乳杆菌 $\geq 8 \times 10^8$ 个，每克酵母菌液中含酵母菌 $\geq 7 \times 10^8$ 个，每克芽孢杆菌液中含芽孢杆菌 $\geq 4 \times 10^8$ 个。以上述三元活性微生态制剂的有效成份为芯材，以下述重量份成分的均匀混合物为壁材：变性淀粉 40%、阿拉伯胶 15 %、麦芽糊精 25%、玉米糖浆 20 %；将上述芯材与壁材按 1：1.1 之重量比混合均质后，经常规低温（-20℃）喷雾工艺制成微胶囊状态产品。