

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810054435.9

[51] Int. Cl.
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 9/52 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 101229196A

[22] 申请日 2008.1.14
[21] 申请号 200810054435.9
[71] 申请人 河北师范大学
地址 050016 河北省石家庄市裕华东路 113 号
[72] 发明人 边艳青 吴彦彬 李小俊 裴艳涛
李亚丹 任宏伟 刘 薇

[74] 专利代理机构 石家庄科诚专利事务所
代理人 刘谟培

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称
预防仔猪腹泻的微生态制剂及其制备方法

[57] 摘要
本发明公开了一种预防仔猪腹泻的微生态制剂及其制备方法。本发明的组成为，猪拟杆菌、乳酸杆菌、啤酒酵母菌、枯草芽孢杆菌四种益生菌的活菌数量比为(6~5)：(4~3)：(2~1)：(2~1)，且每克产品的活菌总数 1.3×10^{10} 个/g。本发明在考虑肠道中好氧微生物及厌氧微生物比例的基础上设计了不同益生菌的比例，同时添加了肠道中的优势菌猪拟杆菌，对腹泻预防效果稳定、明显。该微生态制剂不仅能有效、快速的在仔猪体内建立生态平衡，减少抗生素的使用，还能缩短仔猪对饲料的适应期，降低仔猪死亡率，提高仔猪免疫力和饲料利用率，增加养殖效益。

1、一种预防仔猪腹泻的微生态制剂，其特征在于其组成以活菌数的数量比表示为：

猪拟杆菌：乳酸杆菌：啤酒酵母菌：枯草芽孢杆菌=(6~5)：(4~3)：(2~1)：(2~1)；且每克产品的活菌总数大于 10^{10} 个；其中，所说的猪拟杆菌是采用以下方法制备得到的：

(1) 从健康仔猪的肠道内容物中分离拟杆菌属的菌株，经过纯化、鉴定，确定为猪拟杆菌，安全性实验后，保藏备用；

(2) 制备方法采用二级厌氧分批发酵，种子培养基配方为：胰酶解酪蛋白 15.0g，脂胨 5.0g，酵母浸膏 5.0g，牛肉膏 5.0g，葡萄糖 5.0g，氯化钠 5.0g， KH_2PO_4 2.5g，可溶性淀粉 3.0g，L-cys 盐酸盐 0.5g，质量分数为 0.5%的氯化血红素 1mL，质量百分数为 1%维生素 K_1 溶液 0.1mL，加水到 1000mL，PH 7.2~7.4；发酵培养基是将种子培养基中的 L- cys 盐酸盐增加到 0.8g，氯化血红素增加到 2mL，维生素 K_1 增加到 0.2mL，加水到 1000mL，PH 7.2~7.4，以质量分数为 3%~5%的接种量接种，37℃厌氧培养 45h~48h，得到浓度为大于 10^{10} 个/mL 发酵液，经过 2000 转/分钟的离心机处理 20 分钟，得到猪拟杆菌的湿菌体。

2、如权利要求 1 所述的预防仔猪腹泻的微生态制剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 制备猪拟杆菌；

a、从健康仔猪的肠道内容物中分离拟杆菌属的菌株，经过纯化、鉴定，确定为猪拟杆菌，安全性实验后，保藏备用；

制备方法采用二级厌氧分批发酵，种子培养基配方为：胰酶解酪蛋白 15.0g，脂胨 5.0g，酵母浸膏 5.0g，牛肉膏 5.0g，葡萄糖 5.0g，氯化钠 5.0g， KH_2PO_4 2.5g，可溶性淀粉 3.0g，L-cys 盐酸盐 0.5g，质量分数为 0.5%的氯化血红素 1mL，质量百分数为 1%维生素 K_1 溶液 0.1mL，加水到 1000mL，PH 7.2~7.4；发酵

培养基是将种子培养基中的 L- cys 盐酸盐增加到 0.8g，氯化血红素增加到 2mL，维生素 K₁ 增加到 0.2mL，加水到 1000mL，PH 7.2~7.4，以质量分数为 3%~5%的接种量接种，37℃厌氧培养 45h~48h，得到浓度为大于 10¹⁰ 个/mL 发酵液，经过 2000 转/分钟的离心机处理 20 分钟，得到猪拟杆菌湿菌体；

b、猪拟杆菌、乳酸杆菌、啤酒酵母菌、枯草芽孢杆菌用活菌数计数法进行计数，得到活菌的数量，然后按比例混合，用海藻酸钠包被，低温干燥，制成微囊，即得成品。

预防仔猪腹泻的微生物制剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种预防仔猪腹泻的微生物制剂，属于动物微生物制剂的应用及制备技术领域。

背景技术

目前我国畜牧业规模化饲养比例已达 80%。在规模化养殖过程中常出现大面积畜禽的腹泻。尤其是幼畜由于自身肠道微生物平衡建立需要一个过程，因此在建立过程中抵抗力弱，更易发生腹泻，且抗生素的使用效果不理想，由此造成大量死亡，给养殖户带来较大的经济损失。研究发现，通过人工添加肠道益生菌可以帮助仔猪建立肠道微生物平衡，增加幼畜的抵抗力。目前的研究致力于益生菌的种类及使用效果上。国外对人肠道多形拟杆菌的研究表明拟杆菌是人肠道的优势菌群，是肠道微生物中数量最多的厌氧菌，在肠道微生物平衡的建立中起着重要的作用。在其它哺乳动物肠道内也发现类似的结论，而且腹泻和拟杆菌数量的下降有明显的关系。现有技术中用于幼畜腹泻的微生物制剂主要是乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌和酵母菌等益生菌。上述产品存在的主要问题是：对仔猪腹泻的防治效果不明显且效果不稳定。

发明内容

本发明的目的在于提供一种预防仔猪腹泻的微生物制剂。

本发明的目的还在于提供一种预防仔猪腹泻的微生物制剂的制备方法。

本发明的构思如下：从健康仔猪的肠道内容物中分离拟杆菌属的菌株，经过纯化、鉴定，安全性实验后，经发酵、离心得到湿菌体，和已知的益生菌乳酸杆菌、枯草芽孢杆菌、啤酒酵母菌根据肠道微生物好氧菌和厌氧菌的比例混合，经过海藻酸钠包被制成微囊。通过人工喂养，帮助仔猪建立肠道微生物平衡，提高免疫力，从而可以预防仔猪腹泻的发生。

本发明所述的预防仔猪腹泻的微生态制剂的组成以活菌的数量比表示为：

猪拟杆菌：乳酸杆菌：啤酒酵母菌：枯草芽孢杆菌=（6～5）：（4～3）：（2～1）：（2～1），且每克产品的活菌总数大于 10^{10} 个，其中，所说的猪拟杆菌是采用以下方法制备的：

从健康仔猪的肠道内容物中分离拟杆菌属的菌株，经过纯化、鉴定，确定为猪拟杆菌，安全性实验后，保藏备用；

制备方法采用二级厌氧分批发酵，种子培养基配方为：胰酶解酪蛋白 15.0g，脂胨 5.0g，酵母浸膏 5.0g，牛肉膏 5.0g，葡萄糖 5.0g，氯化钠 5.0g， KH_2PO_4 2.5g，可溶性淀粉 3.0g，L-cys 盐酸盐 0.5g，质量百分数为 0.5% 氯化血红素 1mL，质量百分数为 1% 维生素 K_1 溶液 0.1mL，加水到 1000mL，PH 7.2～7.4；发酵培养基是将种子培养基中的 L-cys 盐酸盐增加到 0.8g，氯化血红素增加到 2mL，维生素 K_1 增加到 0.2mL，加水到 1000mL，PH 7.2～7.4。用质量分数为 3%～5% 的接种量接种，37℃ 厌氧培养 45h～48h，得到浓度大于 10^{10} 个/mL 发酵液，经过 2000 转/分钟的离心机处理 20 分钟，得到猪拟杆菌的湿菌体。

本发明所说的预防仔猪腹泻的微生态制剂的制备方法包括以下步骤：

（1）制备猪拟杆菌的菌体；

（2）猪拟杆菌、乳酸杆菌、啤酒酵母菌、枯草芽孢杆菌用活菌数计数法进行计数，得到活菌的数量，然后按比例混合，用海藻酸钠包被，低温干燥，制成微囊，即得微生态制剂成品。

本发明中，乳酸杆菌、啤酒酵母菌、枯草芽孢杆菌均为已知菌种，市场可以购得，或采用常规方法制备即可。

本发明取得的积极效果是：将肠道的优势菌猪拟杆菌用于微生态制剂；并根据肠道微生物的好氧菌及厌氧菌的比例，将猪拟杆菌、乳酸杆菌、枯草芽孢杆菌四种益生菌混合制成有一定比例的益生菌微生态制剂，快速有效的建立仔猪肠道微生态平衡。与其它类似微生态制剂的最大区别就是将肠道优

势菌猪拟杆菌用于微生态制剂，其次是将多种益生菌按照肠道微生态平衡所需的不同数量制备有一定比例的微生态制剂，避免了同类产品益生菌种类不完全、比例不合适造成的效果不稳定等缺点。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明。

实施例 1

一种预防仔猪腹泻的微生态制剂，其组成按活菌数比表示为：

猪拟杆菌：乳酸杆菌：啤酒酵母菌：枯草芽孢杆菌=5.8 : 3.8 : 1.9 : 1.8，且每克产品的活菌总数 1.3×10^{10} 个/g。

其制备方法是：

(1) 猪拟杆菌湿菌体的制备

猪拟杆菌湿菌体的制备采用的是二级厌氧分批发酵。种子培养基具体配方为：胰酶解酪蛋白 15.0g，脂胨 5.0g，酵母浸膏 5.0g，牛肉膏 5.0g，葡萄糖 5.0g，氯化钠 5.0g， KH_2PO_4 2.5g，可溶性淀粉 3.0 g，L-cys 盐酸盐 0.5g，质量分数为 0.5%的氯化血红素溶液 1mL，质量分数为 1%的维生素 K_1 溶液 0.1mL，加水到 1000mL，PH7.2。发酵培养基发酵培养基是将种子培养基中的 L- cys 盐酸盐增加到 0.8g，氯化血红素增加到 2mL，维生素 K_1 增加到 0.2mL，加水到 1000mL， PH7.2。以质量分数为 3%的接种量接种，37℃厌氧培养 45h。得到浓度为 5×10^{10} 个/mL 左右的发酵液。经过 2000 转/分钟的离心离心 20 分钟，得到湿菌体，湿菌体干燥处理。

(2) 啤酒酵母菌湿菌体制备

啤酒酵母菌湿菌体制备采用的是二级补料分批发酵。种子配方为：葡萄糖 40g，酵母膏 5g，硫酸胺 2g，磷酸二氢钾 1g，加水到 1000mL，pH 自然。种子培养 18 小时，以质量分数为 2%的接种量接种到发酵罐中。发酵配方为：葡萄糖 20g，酵母膏 5g，硫酸胺 2g，磷酸二氢钾 1g，加水到 1000mL，pH 自然。在发酵过程中根据残糖、残氮流加补料液。控制参数为 pH 控制 4.5，培养温度 30℃，罐压 0.03Mpa，通气比 1: 0.6~1: 1，溶氧控制 70%~85%，

发酵周期为 18 小时，得到菌体浓度为 10^{10} 个/mL 的发酵液，经 2000 转/分钟离心机处理 20 分钟得到湿菌体。

(3) 枯草芽孢杆菌湿菌体的制备

枯草芽孢杆菌湿菌体的制备采用的是二级补料分批发酵。种子培养基：酵母浸膏 10g，葡萄糖 20g， CaCO_3 20g，加水到 1000mL。种子培养 24 h，以质量分数为 3%~5%的接种量接种。发酵培养基：葡萄糖 10，酵母膏 10g， CaCO_3 10g，pH 7.2。流加培养基：葡萄糖 15g，酵母膏 5g 加水到 1000mL。葡萄糖和酵母膏制成混合液一起流加。发酵 8 h 开始流加。培养温度为 34°C ，发酵周期为 34 h。得到菌体浓度为 3×10^{10} 个/mL 的发酵液，经过 2000 转/分钟的离心 20 分钟，得到湿菌体。

(4) 乳酸杆菌湿菌体的制备

乳酸杆菌湿菌体制备采用的是二级厌氧分批发酵。种子配方为 MRS 培养基：胰蛋白胨 10g，牛肉膏 10g，酵母膏 5g，柠檬酸铵 2g，葡萄糖 20g，磷酸二氢钾 2g，乙酸钠 5g，吐温-80 1g，硫酸镁 0.5g，硫酸锰 0.2g，琼脂 20g，加水到 1000mL，pH 6.4。种子培养时间为 18h。发酵培养基为：葡萄糖 20g，牛肉膏 10g，柠檬酸钠 5g，土温-80 0.5g，氯化钠 2.5g，硫酸镁 1g，胡萝卜汁 50mL，L-半胱氨酸盐酸盐 0.1g，加水到 1000mL，初始 pH6.5，以质量分数为 5%的接种量接种，发酵温度 37°C ，厌氧培养 40h。得到菌体浓度为 2.3×10^{10} 个/mL 酸的发酵液。经过 2000 转/分钟的离心 20 分钟，得到湿菌体。

(5) 微囊制备

上述四种湿菌体，稀释、活菌计数、按比例混合，得混合菌液，混合菌液和海藻酸钠混合，海藻酸钠为质量分数为 3%的终浓度，将海藻酸钠滴入质量分数为 2%的氯化钙中，固化 30 分钟，离心得到湿微囊， 45°C 低温干燥 7 小时，得到预防仔猪腹泻的微生态制剂产品。产品性能为：

产品效力以产品中各种菌的活菌数表示(个/g)。每克产品活菌总数为 1.3×10^{10} 个/g，其中猪拟杆菌为 5.8×10^9 个/g，乳酸杆菌为 3.8×10^9 个/g，啤酒酵母菌及枯草芽孢杆菌分别为 1.9×10^9 个/g 和 1.8×10^9 个/g。

本发明的预防仔猪腹泻的微生态制剂的使用方法是：

仔猪从出生后吃第一次初乳前，从口腔灌服微囊制剂 2g，每日一次至 7 日龄。1 周后，按质量分数为 0.3% 的加量将微囊制剂混入饲料中饲喂至 60 日龄。

其产生的效果是：2007 年初到 2007 年 6 月的时间里，在河北省栾城进行了喂养实验。实验仔猪为分娩日期相同或接近，母猪分娩后，按每窝实产仔猪数分为两组，窝间不混群，初生体重基本相同，共 401 头。实验分成二组，其中 1 组为试验组，共 200 头仔猪，2 组为对照组，共 201 头。试验组按照使用方法进行喂养，对照组从补料开始在饲料中按常规喂养方法添加各种药物，至 60 日龄。

(1) 其对仔猪增重的效果见表 1。

(2) 其对仔猪腹泻的预防效果见表 2。

表 1. 仔猪增重统计表

组别	总头数	体重 (Kg)						
		初生重	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	60 天
试验组	200	1.41±0.08	2.39±0.49	4.01±0.32	5.79±0.40	8.08±0.35	9.96±0.3 5	17.82±0. 53
对照组	201	1.36±0.14	2.25±0.23	3.59±0.19	4.98±0.30	6.86±0.41	8.54±0.2 3	15.45±0. 35
比较 (%)		3.68	6.22	11.69	16.36	17.78	16.63	15.34

表 2. 试验组与对照组仔猪发病率、死活率统计表

组别	头数	发病头数	发病率 (%)	死亡数	死亡率 (%)
试验组	200	39	19.50	9	4.50
对照组	201	95	47.26	43	21.39

实施例 2

一种预防仔猪腹泻的微生态制剂，其组成按活菌数比表示为：猪拟杆菌、乳酸杆菌、啤酒酵母菌、枯草芽孢杆菌=5.9 : 3.7 : 1.4 : 1.4，每克产品的活菌总数为 1.24×10^{10} 个/g。

其制备方法与实施例 1 相同。

产品性能为：

产品效力以产品中各种菌的活菌数表示(个/g)。每克产品活菌总数为 1.24×10^{10} 个/g，其中猪拟杆菌为 5.9×10^9 个/g，乳酸杆菌为 3.7×10^9 CFU/g，啤酒酵母菌及枯草芽孢杆菌分别在 1.4×10^9 CFU/g 和 1.4×10^9 CFU/g。

使用方法同实施例 1。

其产生的效果是：

2007 年 7 月到 2007 年 12 月的时间里，在河北省栾城进行了喂养实验。

具体方法同实施 1。

(1) 其对仔猪增重的效果见表 3。

(2) 其对仔猪腹泻的预防效果见表 4。

表 3. 仔猪增重统计表

组别	总头数	体重 (Kg)						
		初生重	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	60 天
试验组	197	1.38±0.05	2.19±0.32	4.18±0.19	5.36±0.42	7.98±0.28	10.04±0.37	17.68±0.42
对照组	197	1.39±0.18	2.20±0.26	3.54±0.34	4.69±0.52	6.87±0.49	8.40±0.38	15.30±0.39
比较 (%)		-0.71	-0.45	18.07	14.29	16.16	19.52	15.56

表 4. 试验组与对照组仔猪发病率、死活率统计表

组别	头数	发病头数	发病率 (%)	死亡数	死亡率 (%)
试验组	197	30	15.23	6	3.05
对照组	197	84	42.64	35	17.77