

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710035473.5

[43] 公开日 2008 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 101138392A

[22] 申请日 2007.7.30
[21] 申请号 200710035473.5
[71] 申请人 湖南农业大学
地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区湖南农业大学
共同申请人 长沙绿叶生物科技有限公司
[72] 发明人 黄兴国 贺建华 杨承剑 李宗军
黄 璜 文利新

[74] 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
代理人 颜 勇

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称
一种饲用微生态制剂

[57] 摘要
本发明提供了一种饲用微生态制剂。该制剂含有益活菌总数为 9×10^8 CFU/g ~ 1×10^{10} CFU/g，其中德氏乳杆菌为 4×10^8 CFU/g ~ 1×10^{10} CFU/g，枯草芽胞杆菌为 4×10^8 CFU/g ~ 1×10^{10} CFU/g，奇异酵母为 1×10^8 CFU/g ~ 1×10^{10} CFU/g。本发明的饲用微生态制剂含有的活菌是针对动物肠道特性而筛选出来的，对动物消化道环境有很强的适应性，有利于维持动物肠道内环境的微生态平衡，在保证畜禽产品的安全性、保护生态环境方面具有重要意义。

1、一种多菌种配合使用的饲用微生态制剂，其特征在于：该微生态制剂呈黄褐色粉状，含水量 $\leq 10\%$ ，含有益活菌总数为 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中德氏乳杆菌为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，保藏号为 CCTCC M 207096；枯草芽胞杆菌为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，保藏号 CCTCC M 207097；奇异酵母 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，保藏号 CCTCC M 207098。

一种饲用微生物生态制剂

技术领域

本发明涉及饲料工业和畜牧养殖业领域，具体涉及一种利用啤酒糟为主要原料发酵生产的饲用微生物生态制剂。

背景技术

目前，我国主要采用化学药品和抗生素对畜禽的慢性和亚急性腹泻病进行治疗和预防，由于发病原因复杂而收效不大，因此造成用药品种不断更换、药品用量越来越大，由此细菌耐药性大大增强，结果使得畜禽产品中抗生素和化学物质残留量严重超标，在国际市场上明显缺乏竞争力。比如我国向日本出口的肉鸡就因“克球粉”超标，向德国出口的蜂蜜因“杀虫咪”超标被相继退回；运往香港的生猪也被检出了 β -兴奋剂，此外，我国出口的畜产品还有因安眠酮类药物、雌激素、抗菌素类药物超标而被取消出口资格的先例。因此，开发和应用能够替代抗生素的绿色饲料添加剂成为目前亟待解决的问题。

饲用微生物生态制剂是采用已知有益微生物，经培养、发酵、干燥、加工等特殊工艺制成的含有活菌并用于动物饲养的生物制剂或活菌制剂。其他名称如饲用微生物添加剂、益生菌、益生菌剂、益生元、合生素等都属于饲用微生物生态制剂范畴。饲用微生物生态制剂属于营养保健类饲料添加剂，具有无副作用、无残留污染、不产生抗药性等优点，具有抗病、治病、促生长等多种功能。从其内的有益菌种来讲，美国发布了40种安全有效的有益菌种，我国农业部允许使用的有益菌种有干酪乳杆菌、嗜乳酸杆菌、乳链球菌、枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、啤酒酵母菌、沼泽红假单胞菌等12种。依活菌种的组成，有单一菌制剂和复合菌制剂。市售的多为复合菌制剂，只是其中的菌种种类和数量有别而异。

目前国内外关于利用啤酒糟生产饲料蛋白的报道较多：以糖糟和啤酒糟为原料，接入酵母菌生产蛋白饲料，实验结果表明，在糖糟70%、啤酒糟30%

的配比条件下, 固态法发酵发酵基质粗蛋白从 25%提高到 36% [郭建华, 窦少华, 邱然, 等. 利用糖糟与啤酒糟生产蛋白饲料的研究. 饲料工业, 2005, 26(21):48~50.]. 也有利用不同原料配比进行混菌发酵啤酒糟来提高其蛋白质的量的研究, 结果表明, 利用木霉、黑曲霉和酵母混菌发酵, 啤酒糟和麦麸皮配比为 4:1 时, 在 28~30℃, 含水量 65%~70%条件下, 发酵 3 天后蛋白质质量分数提高到 35%以上 [全艳玲, 解生权, 孟素华. 混菌固态发酵啤酒糟的研究. 鞍山钢铁学院学报, 2002, 25(3):180~182.]. 还有研究以啤酒糟为主要原料, 经过初筛、复筛和多菌株优化组合发酵, 筛选到 7 株发酵啤酒糟的优良菌株, 最优发酵产物的粗蛋白含量高达 40.9%, 比对照提高 42.5% [何佳, 田娟, 赵启美. 啤酒糟发酵蛋白饲料优良菌种的筛选. 洛阳农业高等专科学校学报, 1999, 19(4):29~30.].

以上技术方案涉及的菌株主要是为了提高饲料中的蛋白含量而筛选出来的, 活菌所起作用单一且对动物消化道环境的适应性不强, 在动物消化道内的低酸性及胆盐 and 不同酶的共同作用下很快死亡。目前尚未见多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的相关报道。

发明内容

本发明的目的在于针对现有微生态制剂中活菌所起作用单一且对动物消化道环境的适应性不强的缺点, 提供了一种多菌种配合使用的饲用微生态制剂, 该制剂对动物消化道环境有很强的适应性, 有利于维持动物肠道内环境的微生态平衡并能极大地提高动物免疫力。

本发明的目的通过以下技术方案实现:

本发明的微生态制剂呈黄褐色粉状, 含水量 $\leq 10\%$, 含有益活菌总数为 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$, 其中德氏乳杆菌(保藏号 CCTCC M 207096)为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$, 枯草芽胞杆菌(保藏号 CCTCC M 207097)为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$, 奇异酵母(保藏号 CCTCC M 207098)为 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ 。

本发明的饲用微生态制剂的制备方法为：

1) 制备种子液：将德氏乳杆菌（保藏号 CCTCC M 207096）、枯草芽胞杆菌（保藏号 CCTCC M 207097）、奇异酵母（保藏号 CCTCC M 207098）分别接种至 MRS 液体培养基、肉汤液体培养基、马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃下恒温培养 18~24 小时；

2) 制备发酵用固体培养基：按重量比将风干后啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1~2 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份，粉碎，过 40 目筛后混合均匀，加入蒸馏水 100~120 份，充分拌匀后 121℃下高压灭菌 15 分钟，冷却至室温备用；

3) 固态发酵：将步骤 1) 制备的三种菌种子液按体积比 1~2: 1~2: 1~2 混合，以 10%~15% (V/W) 的接种量将混合菌液加入到已灭菌的啤酒糟培养基中，30~34℃下发酵 36~48 小时，制得发酵产物；

4) 将发酵产物进行真空冷冻干燥，即制得饲用微生态制剂。

本发明的优势在于：

1) 本制剂为多菌联合制成的复合型微生态制剂，与单一菌制剂相比较，多种占优势的生理性细菌所起的协同作用更有利于恢复和维持动物肠道内环境的微生态平衡；

2) 本制剂所用菌种是针对动物肠道特性筛选出来的，对动物消化道环境有很强的适应性，能够在动物消化道内长时间存活，对大肠杆菌等有害菌的生长繁殖具有很强的抑制能力，而对于乳酸菌、双歧杆菌等有益菌的生长繁殖则具有促进作用，因此比一般的微生态制剂具有更强的适应性及针对性；

3) 本制剂含有的益菌及其在生长代谢过程中所产生的诸多有益代谢产物，它们共同作用于动物消化道，更有利于促进动物生长及免疫力的提高；

4) 本发明的饲用微生态制剂不仅能为动物的生长提供营养，还能提高动物机体免疫力，从而避免了化学药品和抗菌素滥用问题，保证了畜禽产品的

安全性。

具体实施方式

实施例 1:

1、三种菌的保藏情况:

D、E、F 三种菌已在中国典型培养物保藏中心保藏,保藏日期均为 2007 年 3 月 16 日。

CCTCC 保藏号	菌株号	菌种名称
CCTCC M 207096	菌株 D	德氏乳杆菌(<i>Lactobacillus delbrueckii</i>)
CCTCC M 207097	菌株 E	枯草芽胞杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
CCTCC M 207098	菌株 F	奇异酵母(<i>Saccharomyces paradoxus</i>)

德氏乳杆菌属于乳杆菌,枯草芽胞杆菌属于芽胞杆菌;奇异酵母属于酵母。

2、D、E、F 三种菌的形态、生理生化及代谢特征:

菌株 D 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	+	β -半乳糖苷酶	+/-	D-阿拉伯醇	-
细胞形状	长杆状	龙胆二糖	-	D-纤维二糖	-
细胞直径 $>1.0\mu\text{m}$	+	α -D-乳糖	-	D-果糖	+
形成内生孢子	+	麦芽糖	+/-	墨角藻糖	+
芽孢形成	偏端生	鼠李糖	-	利用柠檬酸盐	+
孢囊膨大	-	D-松三糖	-	硝酸盐还原	-
芽孢形状	卵圆形	D-蜜二糖	-	D-半乳糖	-
伴孢晶体	-	D-阿洛酮糖	-	核糖	+
接触酶	-	D-棉籽糖	-	丙酮酸甲基	-
氧化酶	-	水杨苷	-	琥珀酸甲基	+
淀粉水解	+	七叶苷	-	丙酸	+
D-葡萄糖	+	D-山梨糖	+	丙酮酸	+
D-木糖	-	蔗糖	+	琥珀酸	-
L-阿拉伯糖	-	D-海藻糖	+/-	L-丙氨酸	+/-
D-甘露醇	-	木糖醇	+	甘油	+/-
D-甘露糖	+	乙酸	+	m-肌醇	+/-
吐温 80	+	α -羟基丁酸	+/-	β -羟基丁酸	+/-
明胶	-				

菌株 E 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	+	β-半乳糖苷酶	+/-	D-阿拉伯醇	-
细胞形状	长杆状	龙胆二糖	+	D-纤维二糖	+
细胞直径>1.0 μm	+	α-D-乳糖	-	D-果糖	+
形成内生孢子	+	麦芽糖	+	墨角藻糖	-
芽胞形成	偏端生	鼠子糖	-	利用柠檬酸盐	+
孢囊膨大	-	D-松三糖	+	硝酸盐还原	-
芽胞形状	卵圆形	D-蜜二糖	+	D-半乳糖	-
伴孢晶体	-	D-阿洛酮糖	+	核糖	+
接触酶	+	D-棉籽糖	-	丙酮酸甲基	+
淀粉水解	+	水杨苷	+	琥珀酸甲基	+
明胶液化	+	七叶苷	+	丙酸	-
D-葡萄糖	+	D-山梨糖	+/-	丙酮酸	+
D-木糖	+	蔗糖	+	琥珀酸	+
L-阿拉伯糖	-	D-海藻糖	+	L-丙氨酸	+
D-甘露醇	+/-	木糖醇	-	甘油	+
D-甘露糖	+	乙酸	-	m-肌醇	+
吐温 80	+	α-羟基丁酸	-	β-羟基丁酸	+
明胶	+				

菌株 F 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
菌苔生长	圆形、凸起	i-赤藻糖醇	-	D-蜜二糖	-
表面颜色	白色	麦芽三糖	+	α-D-葡萄糖	+
状态	光滑	D-松三糖	+/-	D-甘露醇	+/-
边缘	全缘	核糖醇	-	水苏糖	+/-
细胞形态	椭圆形	D-甘露糖	+	龙胆二糖	-
繁殖方式	芽殖	D-甘露醇	+/-	松二糖	+/-
假菌丝	-	D-棉籽糖	+/-	N-乙酰-D-葡萄糖胺	+/-
可溶性淀粉	+/-	L-鼠李糖	-	山梨醇	-
吐温 80	-	蔗糖	+	乙酸	-
L-阿拉伯糖	-	山梨醇	-	甘油	+/-
麦芽糖	+/-	D-核糖	-	尿素	-
D-山梨糖	-	D-木糖	-	1,5-酮戊二酸	-
D-半乳糖	+/-	D-海藻糖	-	L-亮氨酸	-
D-阿拉伯醇	-	乙酸	-	L-天冬氨酸	-
D-纤维二糖	-	琥珀酸	-	水杨苷	-

3、发酵用固体培养基的制备：

按重量比将风干后啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1~2 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份粉碎，过 40 目筛后混合均匀，加入蒸馏水 100~120 份，充分拌匀后 121℃下高压灭菌 15 分钟，冷却至室温备用。

4、多菌固态发酵：

将 D、E、F 菌分别从试管斜面上各取一环菌苔接种至 50mlMRS 液体培养基、50ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃恒温培养 18 小时，然后将各菌悬液按 1: 2: 1 (D 菌: E 菌: F 菌) 体积混合，按 10% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 30℃下发酵 36 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量≤10%；含有益活菌总数 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中 D 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，E 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，F 菌含量为 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ 。

实施例 2：

其它同实施例 1。将 D、E、F 菌分别从试管斜面上取一环菌苔接种至 50mlMRS 液体培养基、50 ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃恒温培养 21 小时，然后将各菌悬液按 2:1:2 (D 菌: E 菌: F 菌) 的体积比混合，按 12% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 32℃下发酵 42 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量≤10%；含有益活菌总数 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中 D 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，E 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，F 菌含量为 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim$

1×10^{10} CFU/g。

实施例 3:

其它同实施例 1。将 D、E、F 菌分别从试管斜面上取一环菌苔接种至 50mlMRS 液体培养基、50 ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃恒温培养 24 小时，然后将各菌悬液按 1: 1: 2 (D 菌: E 菌: F 菌) 的体积比混合，按 15% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 34℃下发酵 48 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量 $\leq 10\%$ ；含有益活菌总数 9×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，其中 D 菌含量为 4×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，E 菌含量为 4×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，F 菌含量为 1×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g。

实施例 4 :

本发明所研制的微生态制剂在湖南网岭园艺场工厂化猪场以 0.1%的比例应用于 84 头初始体重 20kg 左右的生长猪的日粮当中，试验期为 28 天，试验结果表明，与抗生素组（吉它霉素和土霉素）相比，本发明所研制的微生态制剂有利于降低生长猪的料肉比，平均降低了 0.34，而腹泻率则降低了 4.94%，日粮中粗脂肪和粗纤维的利用率分别提高了 4.54%、5.33%，猪粪样中的大肠杆菌显著降低，降低幅度为 0.63×10^7 CFU/g，同时乳酸菌和双歧杆菌数量都分别提高了 4.87×10^7 、 0.7×10^7 CFU/g。

实施例 5:

本发明所研制的微生态制剂在湖南农科院种猪场以 0.3%的比例应用于 60 头初始体重为 10kg 左右的断奶仔猪的日粮当中，试验期为 28 天，试验结果表明，与抗生素组（金霉素）相比，本发明所研制的微生态制剂有利于提高

仔猪的生长性能,降低其料肉比,平均降低了 0.22,而腹泻率则降低了 3.16%,粗蛋白、粗脂肪、粗纤维的利用率分别提高了 2.86%、4.25%、4.14%,仔猪粪样中的大肠杆菌降低幅度为 0.44×10^7 CFU/g,同时乳酸菌和双歧杆菌数量都有升高,其升高幅度分别为 3.04×10^7 、 1.42×10^7 CFU/g。