

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200710065017.5

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月8日

[11] 授权公告号 CN 100475952C

[22] 申请日 2007.3.30

[21] 申请号 200710065017.5

[73] 专利权人 北京君德同创农牧科技有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地信息路1
号国际科技园2号楼1105

[72] 发明人 朱元招 张德福 尚秀国 杨立彬
陆文清 石凤云 王长彦 生广旭
张蓝庭 于维军 苏振刚

[56] 参考文献

CN1442075A 2003.9.17

WO2006101060A1 2006.9.28

JP11-285378A 1999.10.19

CN1864518A 2006.11.22

枯草芽孢杆菌粉剂作为鸡饲料添加剂的研究. 郑永利, 雷秋波, 徐润林, 林继球. 中山大学学报(自然科学版), 第37卷第2期. 1998

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任风华

权利要求书1页 说明书14页

[54] 发明名称

一种饲用活菌酸制剂及其专用菌株

[57] 摘要

本发明公开了一种饲用活菌酸制剂及其专用菌株。该饲用活菌酸制剂的活性成分包括枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*) Gendone-01 CGMCCNo. 1946。本发明的饲用活菌酸制剂应用于畜禽, 可完全替代饲用抗生素, 畜禽产品无抗生素残留, 确保人类健康, 同时提高饲料利用效率, 降低饲养成本, 起肠道杀菌、减少腹泻、抗应激与增强免疫功能作用。

1、枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946。

2、一种饲用活菌酸制剂，它的活性成分包括枯草芽孢杆菌枯草亚种 Gendone-01 CGMCC No. 1946。

3、根据权利要求 2 所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述饲用活菌酸制剂的活性成分还含有有机酸。

4、根据权利要求 3 所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述有机酸为柠檬酸、延胡索酸、乳酸、异位酸、乙酸、丙酸、甲酸、苹果酸、山梨酸和琥珀酸及其盐类中的一种或其任意组合。

5、根据权利要求 4 所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述有机酸为柠檬酸、延胡索酸、乳酸、苹果酸及其盐类中的一种或其任意组合。

6、根据权利要求 2-5 中任一所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述饲用活菌酸制剂中，枯草芽孢杆菌枯草亚种 Gendone-01 CGMCC No. 1946 的含量为 $5-50 \times 10^8$ CFU/g。

7、根据权利要求 3-5 中任一所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述饲用活菌酸制剂中，有机酸的含量为 400-800g/kg。

8、根据权利要求 2-5 中任一所述的饲用活菌酸制剂，其特征在于：所述饲用活菌酸制剂中，还含有辅剂。

9、一种培养枯草芽孢杆菌枯草亚种 Gendone-01 CGMCC No. 1946 的方法，是在发酵培养基中，在 32-40℃，培养 33-39 小时，收集得到枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 菌体；

所述发酵培养基的 pH 为 6.0-8.0，由如下物质配成：玉米粉 2.5-3.5g；大豆粉 5.0-7.0 g；蛋白胨 1.5-2.5 g；葡萄糖 2.0-4.0 g；尿素 1.5-2.5 g；七水硫酸镁 0.3-0.7 g；一水硫酸锰 0.3-0.7 g；磷酸二氢钾 0.8-1.2 g，加水定容至 1000ml。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述培养温度为 35-38℃，培养时间 35-37 小时，所述发酵培养基的 pH 为 6.5-7.5，由如下物质配成：玉米粉 3.0 g；大豆粉 6.0 g；蛋白胨 2.0 g；葡萄糖 3.0 g；尿素 2.0 g；七水硫酸镁 0.5 g；一水硫酸锰 0.5 g；磷酸二氢钾 1.0 g，加水定容至 1000ml。

一种饲用活菌酸制剂及其专用菌株

技术领域

本发明涉及一种饲用活菌酸制剂及其专用菌株。

背景技术

随着人民生活水平的提高和对环保意识的加强，对畜产品品质和动物饲养卫生环境的要求越来越高，传统的饲用抗生素添加剂正在逐步被禁止或限制使用，2006年1月，欧盟已经正式决定禁止在畜禽饲料中添加促生长用的抗生素。随后日本、韩国等亚洲发达国家也制定了相应的限制动物产品抗生素残留的政策法规。

寻找抗生素替代物，减轻抗生素禁用对畜禽生产带来的负面影响是各国畜牧业迫切需要解决的问题。国内外众多报道认为，微生态制剂、酸化剂、中草药饲料添加剂、饲用酶制剂、功能性寡糖等可作为抗生素的替代产品，但是由于养殖环境差，酸化剂添加剂量不够，益生菌在肠道内活力不高，实际生产中往往不能完全取代促生长抗生素。复合几种替代品，寻求高活力、耐逆境的微生态制剂，利用其抗菌肽的强大杀菌能力来替代抗生素目前仍然欠缺。

酸化剂、活菌制剂不能完全替代饲用抗生素。酸化剂在猪的应用效果显著，尤其是对断奶仔猪，能弥补胃酸分泌不足的缺陷，激活蛋白酶活性，促进营养物质消化吸收，可作为抗生素替代物的首选产品，但是作为替代品，添加量必需要大，受日粮的缓冲能力影响也较大，生产实践中无法添加大剂量的酸化剂。益生菌作为替代品，其劣势在于活菌制剂易失活、不耐胃的酸性环境、难以在胃肠道菌群中处于竞争优势。

由于受国情的约束，动物饲养的环境条件比较差，我国目前绝大部分的畜禽饲养还离不开抗生素，畜禽产品中抗生素残留比较高，基本不能出口，严重制约了畜牧业的健康发展，所以开发生产能替代抗生素的高效安全饲料添加剂不仅可以提高畜禽品质，而且对于改善生态环境，实现畜牧业持续健康发展都是很有意义的。

发明内容

本发明的目的是提供一种饲用活菌酸制剂及其专用菌株。

本发明所提供的饲用活菌酸制剂的专用菌株是枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01，已于2007年02月15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（简称CGMCC，地址为：北京市海淀区中关村北一条13号），保藏登记号为CGMCC No. 1946。

枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946, 是从北京顺义某养殖场土壤中分离得到的。具体方法如下: 从北京顺义某养殖场的不同地点取土壤12份, 每个土样均在2-3克左右。分别加入到100ml 无菌生理盐水中, 振荡混合1分钟, 然后静置5分钟。各取1ml上清液, 分别加入到10ml 无菌培养液A中 (每升培养液A含有: 葡萄糖 5.0克、蛋白胨 5.0克、牛肉膏 3.0克、酵母粉 1.0克、MgSO₄·7H₂O 0.5克、MnSO₄·H₂O 0.005克, pH 7.0), 同时各加入4种指示菌培养液各1ml (4种指示菌分别为: 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* IVDC C56005; 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* IVDC C79-13; 大肠杆菌K88 *E. coli* IVDC C83901; 大肠杆菌K99 *E. coli* IVDC C83529)。在37°C混合培养48小时 (60rpm低速转动), 然后将培养液置于80°C水浴中保温10分钟, 杀死营养细胞。用无菌生理盐水将处理后的培养液稀释10000倍, 取稀释液0.5 ml均匀涂布在固态培养基B (在培养液A中加入1.8%琼脂) 上, 37°C静置培养48小时, 挑选其中最大的单菌落, 转接在斜面试管中, 在4°C保存。最终筛选出性状优良的枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*), 实验室命名为: Gendone-01 (保藏登记号: CGMCC No. 1946)。

综合枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的形态特征、生理生化特性和 16SrDNA 序列分析的结果, 将其鉴定为枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*)。具体鉴定结果如下:

(1) 菌体的形态特征

革兰氏染色阳性, 细胞形状为杆状, 细胞直径小于等于 1 μm, 形成芽孢, 芽孢不膨大, 芽孢非圆形, 不形成伴孢晶体。

(2) 生理生化特性

草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的生理生化特性如表 1 所示。

表 1 枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的理化特征

试验项目	结果	试验项目	结果
------	----	------	----

接触酶	+	利用葡萄糖产气	-
氧化酶	+	利用柠檬酸盐	+
厌氧生长	-	硝酸盐还原	+
VP 试验	+	50℃生长	+
VP < pH6	+	pH5.7 生长	+
VP > pH7	-	7%NaCl 生长	+
甲基红试验	+	淀粉水解	+
利用碳水化合物产酸		明胶液化	+
葡萄糖	+	分解酪素	+
木糖	+		
L-阿拉伯糖	+		
甘露醇	+		

注：“+”表示阳性结果；“-”表示阴性结果。

(3) 16SrDNA 序列分析

枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的 16SrDNA 序列测定结果如序列表中序列 1 所示。

本发明所提供的饲用活菌酸制剂，它的活性成分包括（主要为）枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946。

为了增强使用效果，所述饲用活菌酸制剂的活性成分还含有有机酸。

所述有机酸可为柠檬酸、延胡索酸、乳酸（乳酸钙）、异位酸、乙酸、丙酸、甲酸（甲酸钙）、苹果酸、山梨酸和琥珀酸等及其盐类中的一种或其任意组合。

所述有机酸优选为柠檬酸、延胡索酸、乳酸、苹果酸及其盐类中的一种或其任意组合。

所述饲用活菌酸制剂中，枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的含量可为 $5-50 \times 10^8$ CFU/g 饲用活菌酸制剂。

所述饲用活菌酸制剂中，有机酸的含量可为 400-800g/kg 饲用活菌酸制剂。

所述饲用活菌酸制剂中，其余成分为饲料用辅剂。现有的饲料用辅剂均可选用，如所述辅剂可为水合二氧化硅、乳清粉和乳糖中的一种或其任意组合。

本发明还提供了一种培养枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的方法。

本发明所提供的培养枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的方法，是在发酵培养基中，在 32-40℃，

培养 33-39 小时，收集得到枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No.1946 菌体；

所述发酵培养基的 pH 为 6.0—8.0，由如下物质配成：玉米粉 2.5-3.5g；大豆粉 5.0-7.0 g；蛋白胨 1.5-2.5 g；葡萄糖 2.0-4.0 g；尿素 1.5-2.5 g；七水硫酸镁 0.3-0.7 g；一水硫酸锰 0.3-0.7 g；磷酸二氢钾 0.8-1.2 g，加水定容至 1000ml。

为了得到较高的菌体产量，所述培养温度为 35—38℃，培养时间 35-37 小时，所述发酵培养基的 pH 为 6.5—7.5，由如下物质配成：玉米粉 3.0 g；大豆粉 6.0 g；蛋白胨 2.0 g；葡萄糖 3.0 g；尿素 2.0 g；七水硫酸镁 0.5 g；一水硫酸锰 0.5 g；磷酸二氢钾 1.0 g，加水定容至 1000ml。

枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No.1946 对大肠杆菌、沙门氏菌和李氏杆菌等多种肠道病原菌有高杀菌力，杀菌效力达到抗生素相近的效果。

常规饲用酸化剂在实际使用时，存在添加量不够、酸化效果不明显、不能有效杀菌等诸多不足；本发明的含有有机酸的饲用活菌酸制剂利用酸化剂对饲料 pH 值、胃肠道 pH 值和酸结合力的降低，直接作用于机体，预先杀菌，减少肠道内有害微生物；再利用能有效杀灭大肠杆菌和沙门氏菌等多种肠道病原菌的枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No.1946，使肠道病原菌数量下降近 100 倍，有益菌数量增加，洁净肠道。从而比使用常规酸化剂更能迅速提高胃肠道酸度，并且是从平衡胃肠道微生物内环境的内在机制上达到降低 pH 和改善消化机能的目的。若在每克本发明的饲用活菌酸制剂中，枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No.1946 活性芽孢体的含量超过 25 亿个，在猪配合饲料中添加 1-3kg/吨的产品就可以完全取代抗生素而不影响动物的生产性能。

本发明的饲用活菌酸制剂可以取代抗生素，仔猪腹泻率大幅度下降，饲料转化率提高 2-5%，生长育肥猪饲料转化率平均提高 2-6%，全程使用后，猪肉产品抗生素残留降低到规定标准之下，达到出口标准，是替代饲用抗生素的绿色新产品。

动物实验结果表明日粮中使用本发明的饲用菌剂显著地促进了胃酸和胃蛋白酶的分泌，提高了胰蛋白酶和淀粉酶的活性，促进了结肠末端乳酸杆菌的繁殖，抑制了大肠杆菌等有害菌的生长，进而显著地提高了断奶仔猪的生产性能，减少了腹泻的发生。

本发明的饲用活菌酸制剂应用于畜禽，可完全替代饲用抗生素，畜禽产品无抗生素残留，确保人类健康，同时提高饲料利用效率，降低饲养成本，起肠道杀菌、

减少腹泻、抗应激与增强免疫功能作用。

配伍高活性芽孢活菌制剂和酸化剂的本发明的饲用活菌酸制剂能够替代饲用抗生素，与普通的活菌制剂相比，本发明的饲用活菌酸制剂中的芽孢杆菌杀灭机体有害菌的能力强10倍以上，芽孢杆菌的芽孢体稳定性极好，使用方便。本发明的饲用活菌酸制剂从传统的部分替代饲用抗生素提升到完全替代猪的饲用抗生素；从在生长育肥期替代抗生素上升到自断奶或断奶后10天始就能替代抗生素；肉产品抗生素残留降低到标准规定以下。同时，本发明的饲用活菌酸制剂不影响动物的生长性能，能够有效控制仔猪腹泻。

具体实施方式

下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

实施例 1、枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的培养及安全性检测

1、菌体培养

该实施例所用的种子培养基的组成为：每升培养液含有：葡萄糖 5.0 克、蛋白胨 5.0 克、牛肉膏 3.0 克、酵母粉 1.0 克、MgSO₄·7H₂O 0.5 克、MnSO₄·H₂O 0.005 克，pH 7.0。

发酵培养基的成分 (g/L)：玉米粉 3.0；大豆粉 6.0；蛋白胨 2.0；葡萄糖 3.0；尿素 2.0；七水硫酸镁 0.5；一水硫酸锰 0.5；磷酸二氢钾 1.0，pH6.5-7.5。

将经活化的枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 用接种环挑取 2 环于种子培养基中，摇床振荡培养 24h 后，取 2% (体积比) 种子培养液转接至装有 3.6 吨发酵液的 5 吨发酵罐中培养 36 小时。其中，培养温度为 35-38°C；通风量：0-6 小时，0.2vvm；6-10 小时，0.4vvm；10-18 小时，0.6vvm；18-36 小时，0.4vvm。发酵结束后，用玉米芯粉 (粒径为 0.02-0.20mm) 与培养液混合，按重量比例为 1: 1 (玉米芯粉/培养液)。在 50-60°C 通风干燥至含水量为 10%，然后打包封口，得到饲用活菌剂。该饲用菌剂中，芽孢体数量为每克 100 亿 CFU，比常规技术生产的活菌含量高 5-10 倍。

2、安全性评价

选择 12 只体重基本一致的 SD 大鼠，初始体重为 200±20 克，雌雄各半，分为 2 个试验组。一组用 5ml 枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 芽孢悬液 (2-5×10⁸cfu/ml) 注射到大鼠腹腔内，另一组用 5ml 无菌生理盐水作为对照。注射前禁食 6 小时，灌服后观察其中毒症状，时间为 1 周。结果表明所有灌服枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp.*

subtilis) Gendone-01 CGMCC No. 1946 芽孢悬液的大鼠均无明显临床症状，无一死亡。试验组和对照组没有明显差异。枯草芽孢杆菌作为公认安全（GRAS）的一种细菌，在自然界中广泛存在，可以安全使用。

实施例 2、饲用活菌酸制剂的制备

用实施例 1 制备的饲用活菌剂配制饲用活菌酸制剂，其组成如表 2 所示。其中枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) Gendone-01 CGMCC No. 1946 的含量为 1.4×10^9 CFU/g 饲用活菌酸制剂。

表 2 饲用活菌酸制剂的组成

原料名称	配比 (千克)
水合二氧化硅 (辅料)	8
实施例 1 制备的饲用活菌剂	14
无水乳酸钙	10
无水柠檬酸	40
富马酸	5
苹果酸	3
乳糖 (作为辅料)	20
合计 (公斤)	100

其制备方法如下：

每批次生产量 250 公斤，先称取无水柠檬酸 100 公斤、无水乳酸钙 25 公斤、富马酸 12.5 公斤、苹果酸 7.5 公斤，与水合二氧化硅 20 公斤进行充分混合，必要时对大颗粒的有机酸（富马酸等）进行粉碎，要求全部过 60 目筛。下一步将混合好的有机酸（及其盐类）和辅料共 165 公斤与 35 公斤实施例 1 制备的饲用活菌剂（100 亿 CFU/g 饲用活菌剂）、50 公斤乳糖充分混合。最后过筛、检验、称量、包装后即成为成品。

实施例 3、动物实验

该动物实验中的百分含量均为质量百分含量。

1、实验设计

该动物实验中，选用 21 日龄，平均体重为 5.3 ± 0.1 kg 的（杜洛克×长白×大白）断奶仔猪 72 头，分为 4 个处理，每个处理 18 头。第一组为对照组，只饲喂表 3 的基础日粮 a；第二组为饲用活菌酸制剂组，饲喂日粮 b；第三组为乐达酸组，饲喂日粮 c；第四组为强酸灵组，饲喂日粮 d。每个处理 6 个重复，每个重复 3 头猪。饲养期为 28 天。

其中，基础日粮 a 以玉米、膨化豆粕、膨化大豆为主，并少量添加鱼粉、乳清

粉和葡萄糖。基础日粮 a 的组成和营养水平见表 3。在基础日粮 a 的基础上，降低玉米的用量，日粮中分别添加实施例 2 制备的饲用活菌酸制剂、乐达酸（西班牙乐达公司）或强酸灵（珠海溢多利公司生产），得到日粮 b、日粮 c 和日粮 d。

表 3 基础日粮 1 的组成及营养水平

原料名称	比例(%)	主要营养指标	
玉米	57.0	消化能(kcal/kg)	3379
膨化豆粕	13.4	粗蛋白(%)	18.00
膨化大豆	7.0	钙(%)	0.83
进口鱼粉	7.0	有效磷(%)	0.55
葡萄糖	5.0	赖氨酸(%)	1.25
乳清粉	6.0	蛋氨酸(%)	0.41
豆油	1.5	蛋+胱氨酸(%)	0.73
氢钙	1.2	苏氨酸(%)	0.86
石粉	0.5	色氨酸(%)	0.21
乳猪预混料	0.5		
精盐	0.2		
赖氨酸	0.3		
苏氨酸	0.12		
蛋氨酸	0.08		
氯化胆碱	0.12		
氧化锌	0.24		
乙氧基喹啉	0.07		

日粮 b 的组成与基础日粮 a 相比，除玉米的百分含量为 56.9%，添加 0.1% 的实施例 2 制备的饲用活菌酸制剂外，其它原料同基础日粮 a。

日粮 c 的组成与基础日粮 a 相比，除玉米的百分含量为 56.75%，添加 0.25% 的乐达酸（西班牙乐达公司）外，其它原料同基础日粮 a。

日粮 d 的组成与基础日粮 a 相比，除玉米的百分含量为 56.8%，添加 0.2% 的强酸灵（珠海溢多利公司生产）外，其它原料同基础日粮 a。

2、饲养管理

供试猪饲养于半密闭式保育舍，每个重复仔猪饲养于一栏，颗粒料饲喂，自由采食和饮水，室内温度保持在 22℃ 以上，每天清理消毒舍内卫生，冲洗饮水器。按

正常免疫程序免疫。每天由专人观察记录试验仔猪病死亡情况。

3、数据处理

试验数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计，进行方差分析和 Duncan' s 多重比较。

4、指标检测

(1) 日增重、采食量和料肉比

在试验开始后称测初重，然后每周称重 1 次，结料 1 次，统计采食量，并计算日增重和料肉比。

(2) 腹泻观察及腹泻指数的确定

在试验的头 2 周内每天观察腹泻情况，记录腹泻猪头次数，并根据粪便的情况给予不同分数，统计腹泻指数，具体评分方法见表 4。

表 4 腹泻指数的评分标准

粪便外观	硬粪	均匀粘性粪便	软，部分成型	半液状、糨糊状粪便	水样粪便
评分	1	2	3	4	5

不同处理的日增重、采食量、料肉比、腹泻观察及腹泻指数结果如表 5 所示，与对照组相比，日粮中添加酸化剂均显著地提高了断奶后 4 周内仔猪的日增重 ($P < 0.05$)，以本发明的饲用活菌酸制剂效果最好。饲料中添加本发明的饲用活菌酸制剂有提高仔猪采食量，改善饲料转化效率的趋势，但差异不显著 ($P > 0.05$)。在腹泻指数和腹泻率方面，在断奶后的前两周内，日粮中添加酸化剂均能显著地改善仔猪粪便状况 ($P < 0.05$)，减少腹泻的发生，其中以本发明的饲用活菌酸制剂效果最好。

表 5 饲用活菌酸制剂组对断奶仔猪生产性能和腹泻状况的影响

指标	对照组	饲用活菌酸制剂组	乐达酸组	强酸灵组	SEM	P 值	
初重(kg)	5.3	5.2	5.3	5.3	0.1	0.852	
末重(kg)	12.7 ^a	14.4 ^b	14.3 ^b	13.8 ^{ab}	0.4	0.031	
0~2 周	采食量(g)	246	292	283	267	15	0.213
	日增重(g)	175 ^a	229 ^b	225 ^b	205 ^{ab}	14	0.018
	料肉比	1.41	1.28	1.26	1.30	0.05	0.217
	腹泻指数	2.85 ^c	2.11 ^a	2.36 ^{ab}	2.52 ^b	0.11	0.025
	腹泻头次数	53	9	11	35	0.78	0.012
	腹泻率	21.0	3.6	4.5	13.9	0.46	0.015
采食量(g)	656	718	716	705	21	0.081	

	日增重(g)	355 ^a	426 ^b	422 ^b	405 ^{ab}	18	0.023
	料肉比	1.85	1.69	1.70	1.74	0.07	0.095
0~4周	采食量(g)	451	505	499	486	19	0.065
	日增重(g)	265 ^a	327 ^b	323 ^b	305 ^b	13	0.028
	料肉比	1.70	1.54	1.54	1.59	0.06	0.072

注：字母示方差分析的结果，同一行内标有不同字母的均值在 $\alpha=0.05$ 水平上具显著性差异。

仔猪早期断奶后，由于心理应激、环境应激和营养应激，原有肠道优势菌群—乳酸杆菌等有益菌由于缺乏底物，繁殖存活率大幅度降低，大肠杆菌等有害微生物借机大量繁殖，肠道微生物平衡面临严峻挑战，而此时胃酸分泌不足，胃蛋白酶活性较低，胃内未被消化的营养成分进入肠道后段，为病原菌的繁殖创造了条件，仔猪极易出现营养性腹泻和病原性腹泻。

日粮中添加酸化剂可降低胃内容物的 pH 值，提高胃蛋白酶活性进而促进营养物质的消化吸收，减少仔猪腹泻的发生，这是常规酸化剂采取的基本模式。如果在此基础上，外源添加益生菌，抑制病原微生物的生长，将进一步提高酸化剂的效果。这也是本发明的饲用活菌酸制剂对仔猪的生产性能和腹泻情况的改善要好于其它处理组的主要原因。

(3) 饲料 pH 和酸结合力

饲料的酸结合力是配制高档乳仔猪饲料时经常要考虑的指标，有条件的饲料厂家会定期检测饲料原料和饲料的酸结合力，一般认为，仔猪饲料的酸结合力以 30 左右为宜。在早期的研究中，为了达到这样的酸结合力，往往加入大量的无机酸或有机酸，虽能起到降低饲料的酸结合力的效果，但由于需要加入大量的有机酸或无机酸，提高了饲料成本并对饲料加工机械产生负面影响，因此目前生产中加入大量有机酸来降低日粮酸结合力的做法已不可取。

取 20 g 饲料，加入 30 ml 去离子水，搅拌均匀形成悬浮液，并用酸度计测定其 pH 值。酸结合力则定义为将 100 g 饲料滴定到 pH=4.0 时所消耗盐酸的毫摩尔数。测定结果如表 6 所示，表明添加酸化剂均能降低饲料的 pH 值和酸结合力，以乐达酸的效果最好，强酸灵次之，本发明的饲用活菌酸制剂降低的幅度最低。这主要是由于乐达酸含有大量的无机酸，pH 值较低，使用量较大所致。

表6 对饲料 pH 值和酸结合力的影响

	对照组	饲用活菌酸制剂组	乐达酸组	强酸灵组
饲料 pH 值	6.41	6.22	6.12	6.18
酸结合力 (mmol)	41	38	34	37

(4) 胃酸、酶活和结肠微生物测定

在饲养 2 周后进行屠宰试验, 每个重复取 1 头体况中等的仔猪, 每个处理组取 6 头仔猪, 晨饲后 1 小时后心脏注射麻醉剂, 待失去知觉后, 心脏放血处死。剖开腹腔, 取出内脏, 分离出胃、十二指肠、空肠和回肠, 取部分内容物, 测定 pH 值。

a、胃酸分泌的测定

胃酸实际上就是盐酸, 通过测定胃内容物氯离子浓度饲料来源的氯离子浓度, 可得胃分泌的氯离子浓度。具体方法为, 取胃内容物上清液, 用 AgNO_3 滴定法测定胃内容物和饲料来源的 $[\text{Cl}^-]$, 可得胃酸中的 $[\text{Cl}^-]$ 。

本发明的饲用活菌酸制剂和不同酸化剂对仔猪胃肠道内容物 pH 值和胃酸分泌的影响结果如表 7 所示, 与对照组相比, 日粮中使用本发明的饲用活菌酸制剂、乐达酸和强酸灵均能显著地降低胃内容物的 pH 值 ($P < 0.05$), 其中以本发明的饲用活菌酸制剂效果最好; 日粮中添加本发明的饲用活菌酸制剂显著地降低了十二指肠、空肠和回肠内容物的 pH 值 ($P < 0.05$), 显著地促进了胃黏膜 Cl^- 的分泌 ($P < 0.05$), 说明本发明的饲用活菌酸制剂能够促进胃酸的分泌。与本发明的饲用活菌酸制剂相比, 日粮中使用乐达酸和强酸灵均未对肠道内容物 pH 值, 胃酸的分泌产生显著地影响。

表7 饲用活菌酸制剂对胃肠道内容物 pH 值和胃酸分泌的影响

	对照组	饲用活菌酸制剂组	乐达酸组	强酸灵组	SEM	P-值
胃内容物 pH 值	5.13 ^b	4.52 ^a	4.57 ^a	4.69 ^a	0.08	0.027
十二指肠内容物 pH 值	5.95 ^b	5.57 ^a	5.82 ^{ab}	5.92 ^b	0.11	0.042
空肠末端内容物 pH 值	6.78 ^b	6.35 ^a	6.71 ^{ab}	6.75 ^b	0.13	0.028
回肠末端内容物 pH 值	7.04 ^b	6.32 ^a	6.98 ^b	6.96 ^b	0.15	0.015
总分泌 Cl^- (mmol)	18.5 ^a	67.8 ^b	20.6 ^a	19.3 ^a	1.1	0.031
胃黏膜分泌 Cl^- (mmol/g)	4.8 ^a	17.2 ^b	5.3 ^a	5.1 ^a	0.3	0.018

注: 字母示方差分析的结果, 同一行内标有不同字母的均值在 $\alpha = 0.05$ 水平上具显著性差异。

胃内容物的酸度是由饲料的性质、酸度、胃酸的分泌和肠道菌群本身的产酸力共同决定的。从本次试验的结果来看, 尽管本发明的饲用活菌酸制剂处理组其日粮的酸结合力要高于另外两个使用酸化剂的处理组, 但从胃内容物 pH 值、十二指肠、空肠和回肠 pH 值来说, 三个处理组之间没有差异, 以本发明的饲用活菌酸制剂处理组的胃肠道 pH 值最低, 这可能与活菌酸促进了胃酸的分泌, 提高了胃肠道产酸菌群的繁殖有关。

b、对消化酶活性的影响

胃蛋白酶活性测定采用安森法, 胰蛋白酶活性测定采用施韦而特-竹中法, 淀粉酶活性测定采用 F. I. P 法。上述方法详见《酶的测定方法》(钱嘉渊, 《酶的测定方法》, 北京: 中国轻工业出版社, 1992:21-67, 210-234, 256-270, 324-332)。取胃内容物上清液, 按安森法所测得的为总胃蛋白酶活性, 即总胃蛋白酶=胃蛋白酶+胃蛋白酶原; 调节胃内容物上清液 pH=8.0, 使其中的胃蛋白酶失活, 再按安森法所测定的为胃蛋白酶原活性, 从总酶活性中减去胃蛋白酶原活性, 即得胃蛋白酶活性。

本发明的饲用活菌酸制剂和不同酸化剂对消化酶活性的影响结果如表 8 所示, 与对照组相比, 日粮中添加本发明的饲用活菌酸制剂提高了胃内容物蛋白酶的活性 ($P < 0.01$), 提高了胃蛋白酶原的转化比率 ($P < 0.01$)。添加乐达酸和强酸灵均促进了胃蛋白酶原的转化, 但对胃蛋白酶活性没有产生显著地影响。本发明的饲用活菌酸制剂和乐达酸提高了胰蛋白酶和淀粉酶的活性 ($P < 0.01$), 强酸灵没有产生显著地影响。酸化剂对胃蛋白酶原活性均未产生显著地影响。

表 8 本发明饲用活菌酸制剂对消化酶活性的影响

		对照组	饲用活菌酸制剂组	乐达酸组	强酸灵组	SEM	P-值
胃内容物 胃蛋白酶活性(U)	总酶 (U/g 鲜样)	2.54 ^a	5.65 ^b	2.87 ^a	2.72 ^a	0.18	0.017
	酶活 (U/g 鲜样)	1.42 ^a	4.27 ^b	1.98 ^a	1.64 ^a	0.13	<0.01
	酶/总酶 (%)	55.9 ^a	75.6 ^{bc}	68.9 ^b	60.3 ^{ab}	3.2	<0.01
胃蛋白酶原活性 (U/g 胃黏膜)		341.3	352.7	358.6	347.8	5.8	0.238
十二指肠 内容物酶活	胰蛋白酶 (U/g)	175.6 ^a	668.9 ^c	514.2 ^{bc}	325.7 ^{ab}	72.5	<0.01
	淀粉酶 (U/g)	28.5 ^a	168.5 ^c	73.2 ^b	48.9 ^{ab}	8.6	<0.01

注: 字母示方差分析的结果, 同一行内标有不同字母的均值在 $\alpha = 0.05$ 水平上具显著性差异。

胃蛋白酶和胃酸分泌具有一定的同步性。从本次试验的结果来看，也证实了这一点。本发明的饲用活菌酸制剂在促进胃酸分泌的同时，也促进了胃蛋白酶原向胃蛋白酶的转化，使得本发明的饲用活菌酸制剂处理组胃蛋白的活性显著地高于其它处理组。乐达酸和强酸灵也有促进胃蛋白酶向胃蛋白酶转化的效果，但效果没有本发明的饲用活菌酸制剂那么明显。其原因可能有两个。一是本发明的饲用活菌酸制剂促进了胃蛋白酶的分泌，二是本发明的饲用活菌酸制剂本身含有产生胃蛋白酶的菌群，在胃部产生了一定的胃蛋白酶。

关于酸化剂对小肠消化酶活性的影响，该实验结果表明本发明的饲用活菌酸制剂和乐达酸均能显著地提高胰蛋白酶和淀粉酶的活性，以本发明的饲用活菌酸制剂效果最好。强酸灵也有提高胰蛋白酶和淀粉酶活性的趋势，但差异不显著。

本发明的饲用活菌酸制剂和乐达酸提高胰蛋白酶和淀粉酶活性的机制还不清楚，可能与促进胃蛋白酶和胃液的分泌有关。一方面，食物中的蛋白质被胃蛋白酶水解后，进入到十二指肠后会刺激肠道消化酶的分泌；另一方面，食糜进入十二指肠后，其中的酸（H⁺）会刺激肠道黏膜细胞产生促胰液素，促进富含消化酶的胰液分泌，使得胰蛋白酶和淀粉酶活性提高。

c、结肠微生物的测定

取部分结肠内容物，4℃保存，4小时内送实验室培养大肠杆菌和乳酸杆菌。大肠杆菌采用伊红美兰琼脂需氧培养计数，乳酸杆菌采用乳酸杆菌培养基培养计数。本发明的饲用活菌酸制剂和不同酸化剂对结肠微生物菌群数量的影响结果如表9所示，日粮中添加本发明的饲用活菌酸制剂显著地提高了结肠末端乳酸杆菌的数量（ $P < 0.01$ ），降低了大肠杆菌的数量（ $P < 0.01$ ）。使用乐达酸和强酸灵则未对结肠乳酸杆菌、大肠杆菌数量产生显著地影响。

表9 本发明饲用活菌酸制剂对结肠微生物的影响

	对照组	饲用活菌酸制剂组	乐达酸组	强酸灵组	SEM	P值
乳酸杆菌(10 ⁹ CFU/g)	2.54 ^a	175.3 ^b	9.25 ^a	6.42 ^a	4.21	<0.01
大肠杆菌(10 ⁷ CFU/g)	8.1 ^b	1.8 ^a	5.2 ^{ab}	6.5 ^b	1.5	<0.01

注：字母示方差分析的结果，同一行内标有不同字母的均值在 $\alpha = 0.05$ 水平上具显著性差异。

从本次试验的结果来看，日粮中添加本发明的饲用活菌酸制剂显著地促进了结肠末端乳酸杆菌的繁殖，抑制了大肠杆菌等有害菌的生长。这主要是由于肠道的pH

值会影响到其内部微生物菌群的数量和结构，较低的 pH 值环境能够促进乳酸杆菌等有益菌的生长。此外，由于活菌酸中添加了益生菌，这部分外源的益生菌在肠道内繁殖时也会对大肠杆菌等有害菌的生长起到一定的抑制作用。

该动物实验结果表明在断奶后头四周，日粮中使用酸化剂均显著地提高了断奶仔猪的日增重 ($P < 0.05$)，降低了腹泻指数 ($P < 0.05$) 和腹泻率，其中以本发明的饲用活菌酸制剂效果最好。使用本发明的饲用活菌酸制剂和乐达酸均促进了胃酸和胃蛋白酶的分泌 ($P < 0.05$)，提高了十二指肠内容物中胰蛋白酶和淀粉酶的活性 ($P < 0.05$)，显著地增加了乳酸杆菌的数量，降低了大肠杆菌数量 ($P < 0.05$)。强酸灵有增加十二指肠乳酸杆菌数量的趋势，但差异不显著，对胃酸和胃蛋白酶分泌则没有产生显著地影响。

本发明的饲用活菌酸制剂与益畜宝（益生菌产品，美国雅来公司生产）和乐达酸（复合酸化剂，西班牙乐达公司生产）的性能指标对比结果如表 10 所示。

表 10 发明的饲用活菌酸制剂与益生菌和酸化剂的性能指标对比

指标	活菌酸制剂	益畜宝（益生菌）	乐达酸（复合酸化剂）
杀菌效力（相对值）	100 倍	10 倍	10 倍
替代饲用抗生素	完全替代/部分替代	部分替代	部分替代
能否耐受高温	能	能/不能	能
添加量，kg/t	1-3	1-3	2-5
肉品抗生素残留	无	少/有	少/有
腹泻率降低程度	50-70%	10-20%	5-20%
节约成本，元/头猪	15	8	5

序列表

<160>1

<210>1

<211>1427

<212>DNA

<213>枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*)

<400>1

tccccttcgg cggctggctc cataaagggt acctcaccga cttcgggtgt tacaaactct	60
cgtgggtgtga cgggcgggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgegg catgctgac	120
cgcgattact agcgattcca gcttcacgca gtcgagttgc agactgcat ccgaactgag	180
aacagatttg tgggattggc ttaacctcgc ggtttegctg ccctttgttc tgtccattgt	240
agcacgtgtg tagcccaggt cataaggggc atgatgattt gacgtcatcc ccaccttct	300
ccggtttgtc accggcagtc accttagagt gcccaactga atgctggcaa ctaagatcaa	360
gggttgcgct cgttgcggga cttaacccaa catctcacga cacgagctga cgacaacat	420
gcaccacctg tcaactctgcc cccgaagggg acgtcctatc tctaggattg tcagaggatg	480
tcaagacctg gtaaggttct tcgcgttget tcgaattaaa ccacatgctc caccgcttgt	540
gcgggccccc gtcaattcct ttgagtttca gtcttgcgac cgtaactccc aggcgaggatg	600
cttaatgcgt tagctgcagc actaaggggc ggaaaccccc taacacttag cactcatcgt	660
ttacggcgtg gactaccagg gtatctaatac ctgttcgctc cccacgcttt cgctcctcag	720
cgtcagttac agaccagaga gtcgccttcg ccactgggtgt tcctccacat ctctacgcat	780
ttaccgcta cacgtggaat tccactctcc tcttctgcac tcaagttccc cagtttcaa	840
tgacctccc cggttgagcc gggggctttc acatcagact taagaaaccg cctgcgagcc	900
ctttacgccc aataattccg gacaacgctt gccacctacg tattaccgcg gctgctggca	960
cgtagttagc cgtggctttc tggttaggta ccgtcaaggt gccgcctat ttgaacggca	1020
cttgttcttc cctaacaaca gagctttacg atccgaaaac cttcatcact cacgcggcgt	1080
tgctccgtca gactttcgtc cattgcggaa gattccctac tgctgcctcc cgtaggagtc	1140
tgggccgtgt ctcagtccca gtgtggccga tcacctctc aggtcggcta cgcacgtcg	1200
ccttgggtgag ccgttacctc accaactagc taatgcgccg cgggtccatc tgtaagtgg	1260
agccgaagcc accttttatg tctgaacat gcggttcaga caaccatccg gtattagccc	1320
cggtttcccg gagttatccc agtcttacag gcaggttacc cacgtgttac tcacctgccc	1380
gccgctaaca tcagggagca agctcccatc tgctcgctcg acttgc	1427