



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102660477 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 19

(21) 申请号 201210144048. 0

(22) 申请日 2012. 05. 10

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5760 2012. 02. 16

(73) 专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72) 发明人 刘辉 季海峰 张董燕 王四新

王晶 王雅民

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理

有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

C12N 1/04 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

C12R 1/24 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101548716 A, 2009. 10. 07,

CN 101971920 A, 2011. 02. 16,

CN 102220260 A, 2011. 10. 19,

审查员 朱琳

权利要求书1页 说明书8页

序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种乳杆菌及其冻干菌粉与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种乳杆菌及其冻干菌粉与应用,属于微生物技术领域。所述的乳杆菌名称为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) ZLB004,保藏号为:CGMCC No. 5760,是一株具有耐酸、耐胆盐、耐高温、抑菌性好的菌种。该菌进行发酵培养后进行离心,将菌泥加入冻干保护剂中冻干后得到乳杆菌菌粉。该乳杆菌菌粉作为动物饲料添加剂,能够提高生长猪的日增重,降低料重比,增加肠道中的乳酸菌活菌含量、降低大肠杆菌含量,具有减少动物应激、促进机体健康的作用。

1. 一种乳杆菌, 名称为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) ZLB004, 保藏号为 :CGMCC No. 5760。

2. 一种乳杆菌冻干菌粉, 其特征在于: 采用权利要求 1 所述的短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) ZLB004, 保藏号为 :CGMCC No. 5760。

3. 权利要求 2 所述的乳杆菌冻干菌粉的制备方法, 包括如下步骤: 将权利要求 1 所述的乳杆菌进行发酵培养后得到发酵液, 将发酵液离心分离菌体, 得到菌泥, 向菌泥中加入冻干保护剂乳化冻干后, 即得到所述乳杆菌冻干菌粉;

所述的发酵培养的方法包括如下步骤:

(1) 以 1 ~ 5% 的接种量将所述乳杆菌接种于液体培养基中, 在 35 ~ 40°C 培养 20 ~ 28 小时后得到种子培养物;

(2) 将步骤(1)得到的所述种子培养物以 1 ~ 5% 的接种量接种于装有液体培养基的发酵罐中, 在温度 35 ~ 37°C、转速为 50 ~ 150rpm、罐压为 0.05MPa 的条件下发酵 20 ~ 28 小时, 即得到发酵液;

所述的液体培养基由如下浓度的物质组成: 蛋白胨 10 ~ 14g/L、酵母浸粉 5 ~ 7g/L、牛肉膏 10 ~ 14g/L、葡萄糖 20 ~ 24g/L、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g/L、乙酸钠 5g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L、 $MnSO_4 \cdot 0.19g/L$ 、柠檬酸氢二铵 2g/L 和吐温 -80 1ml/L, pH6.5, 121°C 灭菌 15min 备用。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于: 所述的离心是在 15000 ~ 20000rpm 条件下以管式离心机离心发酵液, 分离菌体, 得到菌泥。

5. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于: 所述乳化冻干是指将菌泥加入与离心前体积相同的冻干保护剂, 制成菌悬液, 乳化均匀后冻干, 即得到乳杆菌冻干菌粉; 所述冻干是在如下条件下进行: 将乳化后的菌悬液预冻 1 ~ 3 小时、冷凝温度 -60 ~ -40°C、真空度 1 ~ 10Pa、冻干时间 20 ~ 28 小时;

所述冻干保护剂由如下质量百分比浓度的物质组成: 谷氨酸钠 1.5 ~ 2.5%、乳糖 2 ~ 4%、海藻糖 4 ~ 6%、脱脂乳 18 ~ 22%, 其余为水。

6. 权利要求 2 所述乳杆菌冻干菌粉在动物饲料添加剂中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 所述动物指猪。

一种乳杆菌及其冻干菌粉与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,特别涉及一种乳杆菌及其冻干菌粉与应用。

背景技术

[0002] 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)是普遍存在于人和动物肠道的有益乳酸杆菌,也是乳酸菌属中重要的种群之一,具有高产酸、解毒、抑菌和提高机体免疫能力等多种特性,在维持胃肠道微生态平衡、促进营养消化吸收、抑制致病菌感染及免疫调节、提高动物生长性能等方面具有重要作用。

[0003] 乳酸菌在动物胃肠道内必须达到一定的活菌浓度才能发挥作用,但是乳酸菌对胃酸、胆汁的抗逆性差,对温度也敏感,因此筛选抗逆性高的乳酸菌种成为乳酸菌研究的一个重要内容。另外,乳酸菌产品在常温保存时常常存在活菌数低、稳定性差等质量不稳定的问题,如何提高活菌量并延长活菌保藏期,已成为活菌制剂产品研究开发的技术关键。利用真空冷冻干燥技术生产活菌制剂是一种可以提高活菌有效性的好方法,冻干菌粉不仅具有活菌含量高、用量小、可直接投入生产的特点,而且能够提高产品的保存期和应用效果。真空冷冻干燥会造成部分微生物细胞的损伤、死亡及某些酶蛋白分子的钝化,而适宜的冻干保护剂能够使益生菌在冻干过程中保藏最小限度死亡,减轻冷冻干燥所引起的对菌体的损伤,在保存时耐受较高的温度不损害菌体的活力。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的在于针对生产实践中的实际问题和需求,开发研制出一种新型的乳杆菌,该乳杆菌耐酸、耐胆盐,对温度有一定的耐受性,对猪常见致病菌具有一定的抑制作用;

[0005] 本发明的另一个目的在于提供由该乳杆菌制备得到的冻干菌粉及其制备方法。

[0006] 本发明的又一个目的在于提供所述乳杆菌冻干菌粉在动物饲料添加剂中的应用。

[0007] 为实现本发明第一个目的提供一种乳杆菌,从健康仔猪中筛选出一株性能优良的乳酸菌菌株,将该乳杆菌菌株于2012年02月16日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮政编码:100101)进行保藏,菌株名称为短乳杆菌*Lactobacillus brevis* ZLB004,保藏编号为CGMCC No. 5760。

[0008] 所述乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (CGMCC No. 5760)为革兰氏阳性杆菌,菌体大小为 $0.73\mu\text{m}\times 2.13\sim 9.33\mu\text{m}$,无芽孢。在MRS平板培养基上菌落为乳白色,湿润,液滴状,圆形,表面光滑,凸起,不透明,边缘整齐。

[0009] 本发明提供的乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) (CGMCC No. 5760)除具有上述特征之外,还具有耐酸、耐胆盐、耐高温、抑菌性好等生物学特性:

[0010] 1)该乳杆菌在pH=2的环境中,在2小时以内存活率达到82.35%。一般情况下,动物胃液的pH范围在2~4之间,这种酸性环境条件能够使大部分乳酸菌失活从而导致乳酸

菌不能有效发挥益生作用,而本发明的乳杆菌显示出良好的耐酸性。

[0011] 2) 该乳杆菌在 0.2% 的胆盐环境中,在 6 小时内的存活率达到 44.17%。一般情况下,动物肠道内的胆盐浓度在 0.03% ~ 0.3%,而肠道内容物的排空时间为 2 ~ 6 小时,益生菌要发挥效力必须能够耐受肠道内胆盐环境,本发明的乳杆菌显示出较好的耐受胆盐能力。

[0012] 3) 该乳杆菌在 65℃ 处理 30 秒时仍有 54.27% 的存活率。乳酸菌对温度敏感,在常温保存或是制粒时容易失活影响益生效力的发挥,因此筛选具有耐较高温度的乳杆菌,可以提高乳酸菌的细胞存活率。

[0013] 4) 该乳杆菌对常见致病菌有较强的抑制作用。大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌是猪常见的致病菌,本发明的乳杆菌对这三种致病菌具有较强的抑制作用,可以有效控制动物疾病的发生。

[0014] 本发明的第二个目的提供一种乳杆菌冻干菌粉,采用所述短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004,保藏号为 :CGMCC No. 5760。

[0015] 上述乳杆菌冻干菌粉的制备方法,包括如下步骤:将乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (CGMCC No. 5760) 进行发酵培养后得到发酵液,将所述发酵液离心分离菌体,得到菌泥,向所述菌泥加入冻干保护剂乳化冻干后,即得到所述乳杆菌冻干菌粉。

[0016] 所述发酵培养为二级发酵,包括如下步骤:

[0017] (1) 以 1 ~ 5% 的接种量将所述乳杆菌接种于液体培养基中,在 35 ~ 40℃ 培养 20 ~ 28 小时后得到种子培养物;

[0018] (2) 将步骤(1)得到的所述种子培养物以 1 ~ 5% 的接种量接种于装有 30 ~ 40L 液体培养基的 50L 发酵罐中,在温度 35 ~ 37℃、转速为 50 ~ 150rpm、罐压为 0.05MPa 的条件下发酵 20 ~ 28 小时,即得到发酵液。

[0019] 所述的液体培养基由如下浓度的物质组成:蛋白胨 10~14g/L、酵母浸粉 5~7g/L、牛肉膏 10~14g/L、葡萄糖 20~24g/L、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g/L、乙酸钠 5g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L、 $MnSO_4$ 0.19g/L、柠檬酸氢二铵 2g/L 和吐温 -80 1ml/L, pH 6.5, 121℃ 灭菌 15min 备用。

[0020] 所述的离心是在 15000 ~ 20000rpm 条件下以管式离心机离心发酵液,分离菌体,得到菌泥。

[0021] 所述的乳化冻干是指将菌泥加入与离心前体积相同的冻干保护剂,制成菌悬液,乳化均匀后冻干,即得到乳杆菌冻干菌粉。冻干条件为将乳化后的菌悬液预冻 1~3 小时、冷凝温度 -60~-40℃、真空度 1~10Pa、冻干时间 20 ~ 28 小时。所述冻干保护剂由如下质量百分比浓度的物质组成:谷氨酸钠 1.5 ~ 2.5%、乳糖 2 ~ 4%、海藻糖 4 ~ 6%、脱脂乳 18~22%,其余为水。

[0022] 所述乳杆菌冻干菌粉在动物饲料添加剂中的应用也属于本发明的保护范围。本发明的乳杆菌冻干菌粉作为添加剂应用于动物饲料,其中动物包括但不限于猪、牛、羊、鸡等动物,其优选猪。

[0023] 本发明还提供一种冻干保护剂,由如下质量百分比浓度的物质组成:谷氨酸钠 1.5 ~ 2.5%、乳糖 2 ~ 4%、海藻糖 4 ~ 6%、脱脂乳 18~22%,其余为水。

[0024] 本发明的乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (CGMCC No. 5760) 是一株具有耐酸、耐胆盐、耐高温、抑菌性好的菌种。由该乳杆菌制成的冻干菌粉添加到生长猪饲料中,能

够提高生长猪的日增重,降低料重比,增加肠道中的乳酸菌活菌含量、降低大肠杆菌含量,具有减少动物应激、促进机体健康的作用。

[0025] 保藏说明:

[0026] 菌株名称:短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* ZLB004

[0027] 保藏日期:2012年02月16日

[0028] 保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0029] 保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮政编码:100101

[0030] 保藏编号:CGMCC No. 5760

附图说明

[0031] 图1为API 50CH (L)微生物鉴定系统结果。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例详细介绍本发明,应理解,本发明要求保护的范围不受所述具体实施方案的限制,本发明提供的具体实施例仅作为进一步说明本发明的例子,本领域技术人员参照本案说明书的描述可以很容易对本发明的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换,这些无需创造性劳动的改进和替换也应落入本发明所附权利要求书的保护范围之内。

[0033] 实施例1、乳杆菌的筛选鉴定

[0034] 剖杀健康仔猪,无菌操作刮取胃肠道黏膜上的内容物一定量于无菌生理盐水中,振荡摇匀并作十倍稀释,涂布于MRS培养基平板上,烛缸法37℃培养24~48小时。从中挑取乳白色菌落进行初步筛选,凡是革兰氏染色阳性、H₂O₂酶试验阴性、菌体形态为杆状的菌株可初步确定为乳杆菌,将初筛得到的菌株进行生长OD_{600nm}值、产酸OD_{450nm}值、及耐酸耐胆盐试验,筛选出一株性能优良的乳酸菌菌株ZLB004,送至中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)进行鉴定,经API微生物鉴定系统鉴定和16srDNA序列分析表明,该菌鉴定为*Lactobacillus brevis*,其鉴定结果见图1和序列表中序列1。乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)ZLB004主要生物学特性为革兰氏染色阳性,无芽孢。菌落乳白色,湿润,液滴状,圆形,表面光滑,凸起,不透明,边缘整齐。

[0035] 将该乳杆菌菌株于2012年02月16日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮政编码:100101)进行保藏,菌株名称为短乳杆菌*Lactobacillus brevis* ZLB004,保藏编号为CGMCC No. 5760。

[0036] MRS固体培养基配方:蛋白胨1g,牛肉膏1g,酵母膏0.5g,柠檬酸氢二胺0.2g,葡萄糖2g, KH₂PO₄0.2g,乙酸钠0.2g,吐温-800.1ml,硫酸镁0.058g,硫酸锰0.02g,琼脂2g,水100ml, pH 6-6.5, 115℃高压灭菌15min。

[0037] 实施例2、乳杆菌抗逆性研究

[0038] 1、耐酸性能测定

[0039] 将活化的乳杆菌以2%的接种量分别接入到pH为2和3的灭菌生理盐水中,37℃

保温 2 小时,测定活菌数,计算存活率。试验结果见表 1,乳杆菌存活率随 pH 的降低呈下降趋势,但在 pH=2 时其存活率仍高达 82.35%,显示出良好的耐酸性。

[0040] 表 1 乳杆菌耐酸性能测定

	pH	存活率 (%)
[0041]	2	82.35
	3	94.12

[0042] 2、耐胆盐性能测定

[0043] 将活化的乳杆菌以 2% 接种量分别接入到含有 0%、0.1%、0.2%、0.3% 猪胆盐液体 MRS 培养基中保温 3 小时和 6 小时,取一定量菌液测定活菌数,计算存活率,试验结果见表 2。结果表明,乳杆菌的生长受胆盐的抑制,随着猪胆盐浓度越高,保温时间越长,乳杆菌的存活率越低。乳杆菌在 0.2% 胆盐浓度下保温 6 小时仍有 44.17% 的存活率,但在 0.3% 浓度下存活率急剧下降,因此判定该乳杆菌可以耐受的猪胆盐浓度为 0.2%,时间为 6 小时。

[0044] 表 2 乳杆菌耐胆盐性能测定

处理条件	0.10%		0.20%		0.30%	
	3h	6h	3h	6h	3h	6h
[0045]	83.33	66.67	51.67	44.17	6.33	3.33

[0046] 3、耐热性试验

[0047] 将装有 9mL 灭菌生理盐水的试管放入水浴锅中,当试管内外温度相同时加入 1mL 活化的乳杆菌菌液,在不同的温度下分别作用 10 秒、30 秒、60 秒后,迅速置于冷水中进行冷却,测定活菌数。另取 1mL 菌液,不经热处理,测其活菌数作为对照,并计算存活率。由表 3 可以看出,乳杆菌在 65℃ 30 秒时仍有 54.27% 的存活率。

[0048] 表 3 乳杆菌耐热性能测定

	温度 (°C)	时间 (秒)	存活率 (%)
		10	91.02
	55	30	83.27
[0049]		60	57.30
		10	65.33
	65	30	54.27
		60	6.78

[0050] 实施例 3、乳杆菌抑菌试验

[0051] 采用牛津杯法进行乳杆菌对猪常见病菌的抑菌效果试验,结果见表 4。可以看出,该乳杆菌对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用。

[0052] 表 4 乳杆菌抑菌试验

	病原菌	抑菌圈直径(mm)	敏感性判定
[0053]	大肠杆菌	16.0	高度敏感
	沙门氏菌	14.8	中度敏感
	金黄色葡萄球菌	14.3	中度敏感

[0054] 实施例 4、乳杆菌冻干菌粉的制备

[0055] 方法 I

[0056] 1、乳杆菌的发酵

[0057] 将实施例 1 得到的乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (保藏号:CGMCC No. 5760) 以 2% 的接种量接种于三角瓶液体培养基中, 在温度 37℃ 的条件下, 培养 20 小时后得到种子培养物, 再以 2% 的接种量接种于装有 30L 发酵培养基的 50L 发酵罐中, 温度 37℃, 转速为 100rpm, 罐压 0.05MPa, 发酵周期 24 小时, 得到发酵液。

[0058] 所述的液体培养基由如下浓度的物质组成: 蛋白胨 12g/L, 酵母浸粉 6g/L, 牛肉膏 12g/L, 葡萄糖 22g/L, $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g/L, 乙酸钠 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4$ 0.19g/L, 柠檬酸氢二铵 2g/L, 吐温 -801ml/L, pH 6.5, 121℃ 灭菌 15min 备用。

[0059] 2、冻干菌粉的制备

[0060] 将步骤 1 得到的发酵液在 19000rpm 条件下以管式离心机分离菌体, 得到菌泥。将菌泥加入与离心前体积相同的冻干保护剂, 制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液, 充分乳化均匀后进行冻干, 得到乳杆菌冻干菌粉。

[0061] 冻干条件为将乳化后的菌悬液预冻 2 小时、冷凝温度 -50℃、真空度 9Pa、冻干时间 24 小时。冻干保护剂由如下质量百分比浓度的物质组成: 谷氨酸钠 2%, 乳糖 3%, 海藻糖 5%, 脱脂乳 20%, 水 70%, 121℃ 灭菌 15 分钟备用。

[0062] 方法 II

[0063] 1、乳杆菌的发酵

[0064] 将实施例 1 得到的乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (保藏号:CGMCC No. 5760) 以 5% 的接种量接种于三角瓶液体培养基中, 在温度 35℃ 的条件下, 培养 28 小时后得到种子培养物, 再以 5% 的接种量接种于装有 40L 发酵培养基的 50L 发酵罐中, 温度 35℃, 转速为 50rpm, 罐压 0.05MPa, 发酵周期 28 小时, 得到发酵液。

[0065] 所述的液体培养基由如下浓度的物质组成: 蛋白胨 14g/L, 酵母浸粉 7g/L, 牛肉膏 14g/L, 葡萄糖 24g/L, $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g/L, 乙酸钠 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4$ 0.19g/L, 柠檬酸氢二铵 2g/L, 吐温 -801ml/L, pH 6.5, 121℃ 灭菌 15min 备用。

[0066] 2、冻干菌粉的制备

[0067] 将步骤 1 得到的发酵液在 20000rpm 条件下以管式离心机分离菌体, 得到菌泥。将菌泥加入与离心前体积相同的冻干保护剂, 制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液, 充分乳化均匀后进行冻干, 得到乳杆菌冻干菌粉。

[0068] 冻干条件为将乳化后的菌悬液预冻 3 小时、冷凝温度 -40℃、真空度 10Pa、冻干时间 28 小时。冻干保护剂由如下质量百分比浓度的物质组成: 谷氨酸钠 2.5%, 乳糖 4%, 海藻糖 6%, 脱脂乳 22%, 其余为水, 121℃ 灭菌 15 分钟备用。

[0069] 方法III

[0070] 1、乳杆菌的发酵

[0071] 将实施例 1 得到的乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004 (保藏号:CGMCC No. 5760) 以 1% 的接种量接种于三角瓶液体培养基中, 在温度 40℃ 的条件下, 培养 24 小时后得到种子培养物, 再以 1% 的接种量接种于装有 35L 发酵培养基的 50L 发酵罐中, 温度 37℃, 转速为 150rpm, 罐压 0.05MPa, 发酵周期 20 小时, 得到发酵液。

[0072] 所述的液体培养基为适合乳杆菌培养的任何培养基, 其优选的培养基优选的培养基由如下浓度的物质组成: 蛋白胨 10g/L, 酵母浸粉 5g/L, 牛肉膏 10g/L, 葡萄糖 20g/L, $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g/L, 乙酸钠 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 0.19g/L$, 柠檬酸氢二铵 2g/L, 吐温 -80 1ml/L, pH 6.5, 121℃ 灭菌 15min 备用。

[0073] 2、冻干菌粉的制备

[0074] 将步骤得到的发酵液在 15000rpm 条件下以管式离心机分离菌体, 得到菌泥。将菌泥加入与离心前体积相同的冻干保护剂, 制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液, 充分乳化均匀后进行冻干, 得到乳杆菌冻干菌粉。

[0075] 冻干条件为将乳化后的菌悬液预冻 2 小时、冷凝温度 -60℃、真空度 1Pa、冻干时间 20 小时。冻干保护剂由如下质量百分比浓度的物质组成: 谷氨酸钠 1.5%, 乳糖 2%, 海藻糖 4%, 脱脂乳 18%, 其余为水, 121℃ 灭菌 15 分钟备用。

[0076] 实施例 5、乳杆菌冻干菌粉贮存稳定性测定

[0077] 将上述实施例 4 中方法 I 制备的乳杆菌冻干菌粉用铝箔袋真空包装, 常温保存 30 天、60 天、90 天后, 取菌粉用无菌生理盐水进行梯度稀释后, 采用 MRS 培养基测活菌数。结果见表 5, 乳杆菌冻干制剂常温保存 90 天后, 活菌存活率仍可达到 75.64%。

[0078] 表 5 乳杆菌冻干制剂贮存性能测定

	保存时间(天)	活菌数(cfu/g)	存活率(%)
	0	3.13×10^9	100
[0079]	30	2.93×10^9	93.52
	60	2.61×10^9	83.33
	90	2.37×10^9	75.64

[0080] 同时, 用上述方法测定上述实施例 4 中方法 II 和方法 III 制备的乳杆菌冻干菌粉贮存稳定性, 结果与上述方法 I 制备的乳杆菌冻干菌粉贮存稳定性结果一致。

[0081] 实施例 6、乳杆菌冻干菌粉的安全性能测定

[0082] 将上述实施例 4 中方法 I 制备的乳杆菌冻干菌粉送至农业部兽药安全监督检验测试中心(北京)进行安全性检验, 经大鼠、小鼠经口急性毒性试验证明: 乳杆菌冻干菌粉对于大鼠、小鼠经口 LD_{50} 大于 5000mg/kg 体重, 证明该乳杆菌冻干菌粉是安全的, 可以用于动物饲喂。

[0083] 同时, 用上述方法测定上述实施例 4 中方法 II 和方法 III 制备的乳杆菌冻干菌粉安全性能, 结果与上述方法 I 制备的乳杆菌冻干菌粉安全性能结果一致。

[0084] 实施例 7、乳杆菌冻干菌粉在生长猪生产中的应用效果

[0085] 1.1 试验动物与分组

[0086] 选取日龄相近(60±5天)、初始体重相近(24.29±0.33Kg)的生长猪(杜×长×大三元杂交猪)90头,随机分成3组,每组设3个重复,每个重复10头。A组为对照组,饲喂基础日粮+抗生素(每千克全价料添加黄霉素25mg,金霉素75mg,喹乙醇100mg,硫酸粘杆菌素20mg,洛克沙肿50mg),B、C组为试验组,分别添加0.05%和0.1%的上述实施例4中方法I制备的乳杆菌冻干菌粉(乳杆菌终浓度分别为每千克全价饲料 1.57×10^9 CFU和 3.13×10^9 CFU)。试验在半开放式猪舍内进行,水泥地面,地面圈养,自由采食和饮水。免疫、驱虫和消毒按猪场规程进行。试验期为30天。

[0087] 1.2 试验饲料设计

[0088] 试验猪的日粮参照我国《猪饲养标准》配制,日粮配方及营养水平见表6。

[0089] 表6 基础日粮配方和营养水平

	日粮组成	含量 (%)	营养水平	
	玉米	68	消化能(MJ/kg)	13.20
	豆粕	18	粗蛋白质(%)	16.40
	菜籽粕	4	钙(%)	0.69
[0090]	鱼粉	1	总磷(%)	0.55
	麦麸	5	食盐(%)	0.48
	预混料	4	赖氨酸(%)	0.90
	合计	100	蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.57

[0091] 注:预混料为每千克日粮提供:维生素A27000IU;维生素D₃1700IU;维生素E64mg;维生素K₃2.4mg;维生素B₁2.4mg;维生素B₂6.6mg;维生素B₆5mg;维生素B₁₂0.025mg;烟酰胺25.5mg;泛酸13.0mg;生物素0.12mg;铜12mg;铁150mg;锌120mg;锰55mg;碘0.5mg;硒0.18mg。

[0092] 1.3 试验管理

[0093] 试验开始和结束时,个体空腹称重;试验期间,每日观察猪群生长情况,记录饲料消耗和仔猪腹泻情况;试验结束后每组采取新鲜粪样,测定粪中乳酸菌和大肠杆菌活菌数;从每组随机挑选15头猪进行采血,测定血清中结合珠蛋白含量。数据统计采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析,结果以平均值±标准差表示。

[0094] 1.4 结果与分析

[0095] 1.4.1 乳杆菌冻干菌粉对生长猪生产性能的影响

[0096] 由表7可知,B组和C组的日增重均高于对照组;料重比方面,C组和B组显著低于对照组(P<0.01),并且C组和B组的差异显著(P<0.05)。可见,在生长猪日粮中添加一定剂量的乳杆菌冻干菌粉,能够促进猪的生长和饲料效率,从而提高养猪效益。

[0097] 表7 乳杆菌对生长猪生长性能的影响

[0098]

项目	A 组	B 组	C 组
平均日增重(ADG, g/d)	686.83±17.48	701.90±7.17	721.78±12.10
料重比 (F/G)	3.00±0.13 ^{Aa}	2.62±0.09 ^{ABb}	2.24±0.01 ^{Bc}
腹泻率 (%)	0	0	0

[0099] 注:同肩标注不同代表差异显著,大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$),小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

[0100] 1.4.2 乳杆菌冻干菌粉对生长猪粪中乳酸菌和大肠杆菌的影响

[0101] 由表 8 可知,添加乳杆菌冻干菌粉后,C 组的乳酸菌数明显高于对照组($P<0.05$),大肠杆菌数也明显低于对照组($P<0.05$),由此可见,乳杆菌冻干菌粉能够增加生长猪肠道中的有益菌含量,降低有害菌含量,从而维持猪肠道微生态环境的平衡。

[0102] 表 8 猪粪中乳酸菌和大肠杆菌活菌数(单位: \log_{10} cfu/g)

	项目	A 组	B 组	C 组
[0103]	乳酸菌数	9.32±0.03 ^a	9.54±0.10 ^{ab}	9.83±0.01 ^b
	大肠杆菌数	6.98±0.12 ^a	6.52±0.13 ^{ab}	6.23±0.22 ^b

[0104] 注:同肩标注不同代表差异显著,小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

[0105] 1.4.3 乳杆菌冻干菌粉对生长猪血清中结合珠蛋白含量的影响

[0106] 结合珠蛋白(Hp)是一种存在于血清中的急性期蛋白,其含量会随着机体感染、炎症和损伤而增加,被认为是评价动物机体是否健康的主要评定指标。由表 9 可知,日粮中添加乳杆菌能够降低生长猪血清中结合珠蛋白含量,差异极显著($P<0.01$),由此可见,乳杆菌能够减少动物应激、促进机体健康。

[0107] 表 9 乳杆菌对生长猪血清中结合珠蛋白含量的影响

	项目	A 组	B 组	C 组
[0108]	结合珠蛋白 (mg/ml)	0.46±0.01 ^A	0.35±0.03 ^B	0.32±0.03 ^B

[0109] 注:同肩标注不同代表差异显著,大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。

[0110] 同时,用上述方法测定上述实施例 4 中方法 II 和方法 III 制备的乳杆菌冻干菌粉在生长猪生产中的应用效果,结果与上述方法 I 制备的乳杆菌冻干菌粉的应用效果一致。

[0001]

序列表

<110> 北京市农林科学院

<120> 一种乳杆菌及其冻干菌粉与应用

<130> P120023/NLK

<160> 1

<210> 1

<211> 1467

<212> DNA

<213> 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ZLB004

<400> 1

ctgcagtcga acgagcttcc gttgaatgac gtgcttgcac tgatttcaac aatgaagcga 60

gtggcgaact ggtgagtaac acgtgggaaa tctgcccaga agcaggggat aacacttgga 120

aacaggtgct aataccgtat aacaacaaaa tccgcatgga ttttgttga aaggtggctt 180

eggctateac ttctggatga tceceggcg tattagttag ttggtgaggt aaagcccac 240

caagacgatg atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg 300

gccc aaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg 360

gagcaatgcc gcgtagtga agaagggttt cggetcgtaa aactctgttg ttaaagaaga 420

acacctttga gagtaactgt tcaagggttg acggtattta accagaaagc cacggctaac 480

[0002]

tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgteccgatt tattgggcgt	540
aaagcgagcg caggcggttt ttttaagtctg atgtgaaagc cttecggetta accggagaag	600
tgcatcggaa actggggagac ttgagtgcag aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg	660
tggaatgcgt agatataatgg aagaacacca gtggcgaagg cggetgtcta gtctgtaact	720
gacgctgagg ctcgaaagca tgggtlgega acaggallag alaccctggf agtccatgce	780
gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctga gctaacgcat	840
taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc	900
ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc	960
ttgacatctt ctgccaatct tagagataag acgttccctt cggggacaga atgacaggtg	1020
gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagteccgc aacgagcgca	1080
acccttatta tcagttgcca gcattcagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa	1140
ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacagc	1200
tgtacaatg gacggtacaa cgagttgcga agtcgtgagg ctaagctaat ctcttaaagc	1260
cgttctcagt tcgattgta ggctgcaact cgctacatg aagttggaat cgctagtaat	1320

[0003]

cgcgatcag catgccgcg tgaatacgtt ccgggcctt gtacacaccg ccgtcacac	1380
catgagagtt tgtaacaccc aaagccgggtg agataacctt cgggagtcag ccgtetaagg	1440
tgggacagat gattagggga agtcgac	1467

