



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106047769 B

(45)授权公告日 2020.01.31

(21)申请号 201610635151.3

(22)申请日 2016.08.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106047769 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(83)生物保藏信息
CGMCC No.12553 2016.05.27

(73)专利权人 北京好实沃生物技术有限公司
地址 100044 北京市海淀区高粱桥斜街59
号中坤大厦903

(72)发明人 李雪平

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 王文君

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/18(2006.01)

C12N 1/04(2006.01)

A23K 10/18(2016.01)

C12R 1/07(2006.01)

C12R 1/46(2006.01)

C12R 1/865(2006.01)

(56)对比文件

CN 104293697 A,2015.01.21,

CN 104293697 A,2015.01.21,

CN 105483057 A,2016.04.13,

审查员 张丽华

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种含凝结芽孢杆菌的复合菌剂及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种含凝结芽孢杆菌的复合菌剂,该复合菌剂含有凝结芽孢杆菌、粪肠球菌及酿酒酵母菌混合发酵的活性菌泥和稳定化保护剂,所述活性菌泥与稳定化保护剂质量比0.3-1.0:1.0-3.0,该复合菌剂中前述三种菌的有效活菌数分别为 $\geq 4.5 \times 10^{10}$ CFU/g、 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g、 $\geq 4.0 \times 10^9$ CFU/g。本发明的复合益生菌剂不但能促进动物对饲料的消化吸收、节约成本,而且还可调节动物肠道内环境,从而提高动物免疫力、促进动物健康生长,显著提高了动物的生产性能,降低了生产成本。本发明提供了该复合菌剂的制备方法,解决了单菌发酵生产的能耗高、容易污染、工艺繁琐等问题,提高了各菌种生物活性。

1. 一种含凝结芽孢杆菌的仔猪饲料用复合菌剂,其特征在于,

是将凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)分别发酵得到二级发酵液后,将三种菌的二级发酵液按照体积比2:1:1的比例接种到三级发酵培养基中发酵,当发酵液中凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL时发酵结束,将发酵液离心得到复合菌剂活性菌泥,再将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.3-1.0:1.0-3.0混合均匀即得;

所述含凝结芽孢杆菌的仔猪饲料用复合菌剂含有凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)和稳定化保护剂;其中,凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)为保藏编号为CGMCCNo.12553的凝结芽孢杆菌HEW-B379;粪肠球菌为保藏编号为CGMCCNo.9353的粪肠球菌;

有效活菌数分别为:凝结芽孢杆菌 $\geq 4.5 \times 10^{10}$ CFU/g、粪肠球菌 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,酿酒酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ CFU/g;

其中,所述稳定化保护剂为通过以下方法制备得到的稳定化保护剂:

将多维生素0.1-10份、羧甲基纤维素0.5-5份、麦芽糖0.5-4份和多聚糖2-6份加入35-50份水中,800-1200r/m转速搅拌均匀得混合物,然后将混合物加入20-50份水中,边加边搅拌,并依次加入30-50份可溶性淀粉和1-8份甘油,搅拌,充分溶解,混合10-20min即得稳定化保护剂。

2. 如权利要求1所述的复合菌剂,其特征在于,所述稳定化保护剂通过以下方法制备得到:以重量份数计,准确称取可溶性淀粉30-50份, V_E 、 V_C 、 V_D 、 V_A 、 V_{B1} 、 V_{B2} 、 V_{B12} 按照1:2:1:1.5:1:1:1质量比例混合而成的多维生素0.1-10份,羧甲基纤维素0.5-5份,甘油1-8份,多聚糖2-6份,麦芽糖0.5-4份,首先取35-50份水将多维生素、羧甲基纤维素、麦芽糖和多聚糖800-1200r/m转速搅拌均匀得混合物,然后将混合物加入20-50份水中,边加边搅拌,并依次加入可溶性淀粉和甘油,搅拌,充分溶解,混合10-20min即得稳定化保护剂。

3. 权利要求1-2任一所述复合菌剂在非疾病治疗目的的提高仔猪生产性能或在仔猪养殖中的应用。

4. 制备权利要求1-2任一所述复合菌剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)分别进行一级种子发酵、二级种子发酵,得到二级发酵液;其中,凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)为保藏编号为CGMCCNo.12553的凝结芽孢杆菌HEW-B379;粪肠球菌为保藏编号为CGMCCNo.9353的粪肠球菌;

(2) 将凝结芽孢杆菌、粪肠球菌、酿酒酵母菌的二级发酵液分别按照与三级发酵培养基的体积比2%、1%、1%的比例接种到三级发酵培养基中发酵,当发酵液中凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL时发酵结束;离心三级发酵液得到复合菌剂活性菌泥;

(3) 将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.3-1.0:1.0-3.0混合均匀即得。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,步骤(1)中

凝结芽孢杆菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:红糖1%-5%,大豆蛋白胨

0.5%–1.5%，酵母膏0.3%–1.0%，NaCl 0.1%–0.5%，K₂HPO₄ 0.2%–0.5%，硫酸镁0.01%–0.1%，MnSO₄ 0.05%–0.15%，余量为水，pH7.0±0.2；

粪肠球菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为：蔗糖1%–3%，黄豆粉0.5%–1%，玉米浆干粉0.5%–1.5%，柠檬酸氢二铵0.2%–0.7%，硫酸亚铁0.02%–0.1%，吐温-80 0.1%–0.3%，K₂HPO₄ 0.05%–0.15%，MgSO₄·7H₂O 0.01%–0.03%，MnSO₄·4H₂O 0.01%–0.05%，余量为水，pH7.0±0.2；

酿酒酵母菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为：糖蜜1.5%–2.5%，酵母粉0.5%–1.5%，麦芽粉0.5%–1.5%，蛋白胨1%–3%，余量为水，pH7.0±0.2；

上述%为质量百分比。

6. 如权利要求4所述的方法，其特征在于，步骤(1)得到的各菌的二级发酵液中有效活菌数分别为凝结芽孢杆菌 $\geq 2.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 1.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 1.0 \times 10^9$ cfu/mL。

7. 如权利要求4–6任一所述的方法，其特征在于，步骤(2)中将三种菌接种到三级发酵培养基中后，发酵方法为：发酵温度控制在28–32℃，进行18–22h的有氧发酵，使凝结芽孢杆菌成为优势菌群并迅速增殖，使pH降至4.7–5.2，进行恒压厌氧发酵，温度仍然控制在28–32℃，进行22–26h的厌氧发酵，使粪肠球菌和酵母菌成为优势菌群并迅速增殖。

8. 一种稳定化保护剂用于制备复合菌剂的用途，其特征在于，

所述复合菌剂通过包括以下步骤的工艺制备而得：

(1) 凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)分别进行一级种子发酵、二级种子发酵，得到二级发酵液；其中，凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)为保藏编号为CGMCCNo.12553的凝结芽孢杆菌HEW-B379；粪肠球菌为保藏编号为CGMCCNO.9353的粪肠球菌；

(2) 将凝结芽孢杆菌、粪肠球菌、酿酒酵母菌的二级发酵液分别按照与三级发酵培养基的体积比2%、1%、1%的比例接种到三级发酵培养基中发酵，当发酵液中凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL时发酵结束；离心三级发酵液得到复合菌剂活性菌泥；

(3) 将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.3–1.0:1.0–3.0混合均匀即得；

所述的复合菌剂为含凝结芽孢杆菌的仔猪饲料用复合菌剂，其中含有凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)和稳定化保护剂；

有效活菌数分别为：凝结芽孢杆菌 $\geq 4.5 \times 10^{10}$ CFU/g、粪肠球菌 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g，酿酒酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ CFU/g；

所述稳定化保护剂通过以下方法制备得到：将多维生素0.1–10份、羧甲基纤维素0.5–5份、麦芽糖0.5–4份和多聚糖2–6份加入35–50份水中，800–1200r/m转速搅拌均匀得混合物，然后将混合物加入20–50份水中，边加边搅拌，并依次加入30–50份可溶性淀粉和1–8份甘油，搅拌，充分溶解，混合10–20min即得稳定化保护剂。

一种含凝结芽孢杆菌的复合菌剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物发酵技术领域,具体地说,涉及一种含凝结芽孢杆菌的复合菌剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着我国畜牧业的快速发展,其数量与质量、生产与环境以及效益与资源之间的矛盾越来越突出。尤其是畜禽排泄物对环境造成的污染日趋严重,大量的有害物排放使得畜禽场污染物中的BOD(生化需氧量)和COD(化学需氧量)值急剧上升,同时也成为一些疾病发生和传播的潜在诱因。

[0003] 另一方面,食品安全问题正引起越来越多的关注,在造成食品安全问题的诸多原因中,重要原因之一是饲料中使用抗生素作为促生长剂。客观上,抗生素自20世纪50年代以来广泛应用于畜禽养殖业,在促进动物生长,保证动物健康,节约饲料成本,提高经济效益等方面做出了巨大贡献。但由于抗生素在动物养殖业中的长期使用,近些年来,由其所致的毒副作用和药物残留问题已引起人们的关注。2006年,欧盟已经全面禁止了饲料中抗生素的使用,美国和日本等国家也对其做出了严格的限制。2011年,韩国全国禁止在动物饲料中添加抗生素。

[0004] 随着人们对畜产品安全和环境保护意识的不断加强,作为抗生素的替代品,益生菌越来越多的应用于动物营养和饲料中。益生菌是一类能改善动物胃肠道微生态平衡,有益于动物健康和生产性能发挥的微生物添加剂。其主要作用效果体现在改善动物新陈代谢,提高营养物质吸收和利用,提高免疫力,减少环境污染等方面发挥重要作用。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术的不足,利用各菌株之间互利共生、寄生及拮抗等关系,本发明提供了一种复合菌剂及复合菌剂的制备方法。

[0006] 本发明提供的一种含凝结芽孢杆菌的复合菌剂,含有凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)和稳定化保护剂。

[0007] 在本发明的实施例中,使用保藏编号为CGMCC No.12553的凝结芽孢杆菌HEW-B379,但本发明不局限于该菌,本发明的复合菌剂中的三种菌不限于特定编号的凝结芽孢杆菌、粪肠球菌及酿酒酵母菌,本领域技术内公知的属于上述菌的微生物均可适用于本发明的复合菌剂。

[0008] 本发明的复合菌剂中有效活菌数分别为:凝结芽孢杆菌 $\geq 4.5 \times 10^{10}$ CFU/g、粪肠球菌 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,酿酒酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ CFU/g。

[0009] 本发明的复合菌剂中,所述稳定化保护剂通过以下方法制备得到:将多维素0.1-10份、羧甲基纤维素0.5-5份、麦芽糖0.5-4份和多聚糖2-6份加入35-50份水中,800-1200r/m转速搅拌均匀得混合物,然后将混合物加入20-50份水中,边加边搅拌,并依次加入30-50

份可溶性淀粉和1-8份甘油,搅拌,充分溶解,混合10-20min即得稳定化保护剂。

[0010] 本发明的复合菌剂是将凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 及酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) 分别发酵得到二级发酵液后,将三种菌的二级发酵液按照体积比2:1:1的比例接种到三级发酵培养基中发酵,当发酵液中凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL时发酵结束,将发酵液离心得到复合菌剂活性菌泥,再将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.3-1.0:1.0-3.0混合均匀即得。

[0011] 本发明提供了含有上述复合菌剂的动物饲料。

[0012] 本发明提供了含有上述复合菌剂的饲料添加剂。

[0013] 本发明提供了上述复合菌剂在畜禽养殖中的应用。

[0014] 上述在畜禽养殖中的应用是将复合菌益生菌剂添加到饲料和动物饮水中。其中,所述复合菌益生菌剂在饮水中的添加量为 10^7 - 10^9 CFU/L饮水;在饲料中的添加量为 10^6 - 10^9 CFU/kg饲料。

[0015] 本发明提供了上述复合菌剂在提高动物生产性能,促进动物生长发育中的应用。

[0016] 本发明提供了上述复合菌剂在制备动物饲料中的应用。

[0017] 本发明还提供了制备上述复合菌剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0018] (1) 凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 及酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) 分别进行一级种子发酵、二级种子发酵,得到二级发酵液;

[0019] (2) 将凝结芽孢杆菌、粪肠球菌、酿酒酵母菌的二级发酵液分别按照与三级发酵培养基的体积比2%、1%、1%的比例接种到三级发酵培养基中发酵,当发酵液中凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL时发酵结束;离心三级发酵液得到复合菌剂活性菌泥;

[0020] (3) 将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.3-1.0:1.0-3.0混合均匀即得。

[0021] 上述方法中,步骤(1)中

[0022] 凝结芽孢杆菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:红糖1%-5%,大豆蛋白胨0.5%-1.5%,酵母膏0.3%-1.0%,NaCl 0.1%-0.5%, K_2HPO_4 0.2%-0.5%,硫酸镁0.01%-0.1%, $MnSO_4$ 0.05%-0.15%,余量为水,pH7.0 \pm 0.2;

[0023] 优选地,凝结芽孢杆菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:红糖3%,大豆蛋白胨1%,酵母膏0.5%,NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.3%,硫酸镁0.05%, $MnSO_4$ 0.1%,余量为水,pH7.0 \pm 0.2。

[0024] 粪肠球菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:蔗糖1%-3%,黄豆粉0.5%-1%,玉米浆干粉0.5%-1.5%,柠檬酸氢二铵0.2%-0.7%,硫酸亚铁0.02%-0.1%,吐温-80 0.1%-0.3%, K_2HPO_4 0.05%-0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%-0.03%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01%-0.05%,余量为水,pH7.0 \pm 0.2。

[0025] 优选地,粪肠球菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:蔗糖2%,黄豆粉0.5%,玉米浆干粉1%,柠檬酸氢二铵0.5%,硫酸亚铁0.05%,吐温-80 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03%,余量为水,pH7.0 \pm 0.2。

[0026] 酿酒酵母菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为:糖蜜1.5%-2.5%,酵母粉

0.5%–1.5%，麦芽粉0.5%–1.5%，蛋白胨1%–3%，余量为水，pH7.0±0.2；上述%为质量百分比。

[0027] 优选地，酿酒酵母菌发酵时采用的一级、二级种子培养基为：糖蜜2%，酵母粉1%，麦芽粉1%，蛋白胨2%，余量为水，pH7.0±0.2。

[0028] 步骤(1)中凝结芽孢杆菌发酵方法为：取凝结芽孢杆菌甘油管保藏的菌种，接种于300mL一级种子培养基中，进行摇瓶发酵培养，发酵温度为37±5℃、转速200r/min，发酵时间15~25h，得到一级种子液(活菌浓度为10⁹CFU/mL)。将一级种子液转接到50L发酵罐二级种子培养基中，接种量为2%，装液量为20L、发酵温度为37±5℃、搅拌转速150r/min，培养7–15h得到二级种子液，备用。

[0029] 粪肠球菌发酵方法为：将经活化的粪肠球菌甘油管保藏的菌种，直接接种于液体种子培养基，30±5℃、180r/min培养5–10h，得到一级种子液(活菌浓度为10⁹CFU/mL)；将摇瓶种子液按1%的接种量接种于50L发酵罐中，装液量为30L，35±5℃、100r/min发酵3–5h，得到二级种子液，备用。

[0030] 酿酒酵母菌发酵方法为：取酿酒酵母菌甘油管保藏菌种接种于300mL一级种子培养基中，进行摇瓶发酵培养，发酵温度为28±2℃、转速120r/min，发酵时间7–16h，得到一级种子液。将一级种子液转接到50L发酵罐二级种子培养基中，接种量为2%，装液量为25L、发酵温度为28±2℃、搅拌转速120r/min，培养5–12h得到二级种子液，备用。

[0031] 其中，步骤(1)得到的各菌的二级发酵液中有效活菌数分别为凝结芽孢杆菌≥2.0×10⁹cfu/mL、粪肠球菌≥1.0×10⁹cfu/mL、酵母菌≥1.0×10⁹cfu/mL。

[0032] 本发明复合菌剂制备方法的步骤(2)中将三种菌接种到三级发酵培养基中后，发酵方法为：发酵温度控制在28–32℃，进行18–22h的有氧发酵，使凝结芽孢杆菌成为优势菌群并迅速增殖，使pH降至4.7–5.2，进行恒压厌氧发酵，温度仍然控制在28–32℃，进行22–26h的厌氧发酵，使粪肠球菌和酵母菌成为优势菌群并迅速增殖。

[0033] 优选地，发酵方法为发酵温度控制在30℃，进行20h的有氧发酵，使凝结芽孢杆菌成为优势菌群并迅速增殖，使pH降至5，进行恒压厌氧发酵，温度仍然控制在30℃，进行24h的厌氧发酵，使粪肠球菌和酵母菌成为优势菌群并迅速增殖。

[0034] 本发明方法的步骤(3)所述的稳定化保护剂通过以下方法制备得到：将多维生素0.1–10份、羧甲基纤维素0.5–5份、麦芽糖0.5–4份和多聚糖2–6份加入35–50份水中，800–1200r/m转速搅拌均匀得混合物，然后将混合物加入20–50份水中，边加边搅拌，并依次加入30–50份可溶性淀粉和1–8份甘油，搅拌，充分溶解，混合10–20min即得稳定化保护剂。

[0035] 优选地，步骤(3)将活性菌剂和稳定化保护剂按照质量比0.75:1.0混合。

[0036] 本发明方法的步骤(3)是将复合菌活性菌泥和稳定化保护剂按质量比0.3–1.0:1.0–3.0在搅拌罐中搅拌均匀，搅拌转速50r/m，均匀混合30min，并加水使混合料湿度为35%左右，得到菌湿粉；将菌湿粉匀速投入制粒机内，调节粒度为40目，然后进行包衣干燥，并加入包被剂溶液，使菌粉形成包衣膜层，过筛获得复合菌益生菌剂。

[0037] 所述包被剂溶液制备：玉米淀粉2%–5%、聚甘油脂肪酸酯1%–5%、聚乙烯吡咯烷酮1%–3%、羟乙基纤维素2%–4%、果胶0.1%–3%、瓜尔胶0.5%–7%、β-环糊精1%–10%、低聚麦芽糖1%–10%、甘露低聚糖1%–10%，余量为水。

[0038] 本发明还提供了一种用于制备上述复合菌剂的稳定化保护剂，通过以下方法制备

得到:将多维生素0.1-10份、羧甲基纤维素0.5-5份、麦芽糖0.5-4份和多聚糖2-6份加入35-50份水中,800-1200r/m转速搅拌均匀得混合物,然后将混合物加入20-50份水中,边加边搅拌,并依次加入30-50份可溶性淀粉和1-8份甘油,搅拌,充分溶解,混合10-20min即得稳定化保护剂。

[0039] 本发明的有益效果主要体现在:

[0040] (1) 本发明的复合益生菌剂不但能促进动物对饲料的消化吸收、节约成本,而且还可调节动物肠道内环境,从而提高动物免疫力、促进动物健康生长,显著提高了动物的生产性能,降低了生产成本。

[0041] (2) 本发明的益生菌剂用量较少,例如在饮水中仅为 10^5 CFU/L,在饲料中仅为 10^6 CFU/kg时即可发挥显著作用,具体表现在:

[0042] 1) 可显著提高哺乳仔猪的生产性能,有效降低了腹泻率和死亡率:与对照组相比,平均增重提高了13.85%,腹泻率降低了53.23%,死亡率降低了5.8%。

[0043] 2) 可显著提高断奶仔猪的生产性能及免疫性能:与对照组相比,平均增重提高了9.27%,料肉比降低12.5%,腹泻率降低了9.75%。

[0044] (3) 本发明制备复合菌剂的方法不仅解决了单菌发酵生产的能耗高、容易污染、工艺繁琐等问题,而且还能提高各菌种生物活性,并解决菌种退化等问题。

具体实施方式

[0045] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0046] 若未特别指明,实施例中所用的化学试剂均为常规市售试剂,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0047] 以下实施例使用的凝结芽孢杆菌为凝结芽孢杆菌HEW-B379 (*Bacillus coagulans*) 该菌株已于2016年5月27日保藏在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: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,邮编100101),分类命名为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*),保藏编号为CGMCC No.12553。

[0048] 以下实施例使用的粪肠球菌已于2014年6月17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,保藏编号为CGMCC NO.9353,已在中国专利CN104293697A中公开;酿酒酵母菌购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0049] 实施例1复合菌活性菌泥的制备

[0050] 取凝结芽孢杆菌甘油管保藏的菌种,接种于300mL一级种子培养基中,进行摇瓶发酵培养,发酵温度为 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 、转速200r/min,发酵时间15~25h,得到一级种子液(活菌浓度为 10^9 CFU/mL)。将一级种子液转接到50L发酵罐二级种子培养基中,接种量为2%,装液量为20L、发酵温度为 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 、搅拌转速150r/min,培养7-15h得到二级种子液,备用。所述发酵液活菌数 $\geq 2.0 \times 10^9$ CFU/mL。

[0051] 所述一级、二级种子培养基各成分含量为:红糖3%,大豆蛋白胨1%,酵母膏0.5%,NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.3%,硫酸镁0.05%, MnSO_4 0.1%,余量为水,pH 7.0 ± 0.2 ;

[0052] 将经活化的粪肠球菌甘油管保藏的菌种,直接接种于液体种子培养基, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 、180r/min培养5-10h,得到一级种子液(活菌浓度为 10^9 CFU/mL);将摇瓶种子液按1%的接种

量接种于50L发酵罐中,装液量为30L,35±5℃、100r/min发酵3-5h,得到二级种子液,备用。

[0053] 所述发酵液活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/mL;

[0054] 所述斜面培养基各成分含量为:蔗糖2%,黄豆粉0.5%,玉米浆干粉1%,柠檬酸氢二铵0.5%,硫酸亚铁0.05%,吐温-80 0.1%,K₂HPO₄0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.01%,MnSO₄·4H₂O 0.03%,余量为水,pH 7.0±0.2;

[0055] 取酿酒酵母菌甘油管保藏菌种接种于300mL一级种子培养基中,进行摇瓶发酵培养,发酵温度为28±2℃、转速120r/min,发酵时间7-16h,得到一级种子液。将一级种子液转接到50L发酵罐二级种子培养基中,接种量为2%,装液量为25L、发酵温度为28±2℃、搅拌转速120r/min,培养5-12h得到二级种子液,备用

[0056] 所述发酵液活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/mL;

[0057] 所述一级、二级种子培养基质量组分组成为:糖蜜2%,酵母粉1%,麦芽粉1%,蛋白胨2%,余量为水,pH7.0±0.2;

[0058] 所述复合菌活性菌泥制备方法如下:

[0059] 将复合菌种凝结芽孢杆菌、粪肠球菌和酵母菌按照2:1:1的体积比接种到三级发酵培养基中,接种量为凝结芽孢杆菌2%、粪肠球菌1%和酵母菌1%(%为与三级发酵培养基的体积比),发酵温度控制在30℃,进行20h的有氧发酵,使凝结芽孢杆菌成为优势菌群并迅速增殖,使pH降至5.0左右,进行恒压厌氧发酵,温度仍然控制在30℃,进行24h的厌氧发酵,使粪肠球菌和酵母菌成为优势菌群并迅速增殖。发酵结束后进行检测发酵液中各菌株活性,凝结芽孢杆菌 $\geq 5.0 \times 10^9$ cfu/mL、粪肠球菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL、酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ cfu/mL。

[0060] 发酵结束后,三级发酵液经15000r/min离心30min即得复合菌活性菌泥。

[0061] 所述三级培养基质量组成成分:蔗糖1.5%、葡萄糖0.5%、麦芽粉0.5%、玉米浆干粉1.0%、酵母膏1.0%、硫酸锰0.02%、磷酸氢二钾0.5%、硫酸镁0.05%、余量为水,pH6.0±0.2。

[0062] 实施例2稳定化保护剂的制备

[0063] 所述稳定化保护剂的制备方法如下:以重量份数计,准确称取可溶性淀粉30-50份,多维生素(V_E、V_C、V_D、V_A、V_{B1}、V_{B2}、V_{B12}按照1:2:1:1.5:1:1:1质量比例混合而成)0.1-10份,羧甲基纤维素0.5-5份,甘油1-8份,多聚糖2-6份,麦芽糖0.5-4份,首先取35-50份水将多维生素、羧甲基纤维素、麦芽糖和多聚糖800-1200r/m转速搅拌均匀得混合物,然后将混合物加入20-50份水中,边加边搅拌,并依次加入可溶性淀粉和甘油,搅拌,充分溶解,混合10-20min即得稳定化保护剂。

[0064] 实施例3复合菌益生菌剂的制备

[0065] 将实施例1制得的复合菌活性菌泥和实施例2制得的稳定化保护剂按质量比0.75:1.00在搅拌罐中搅拌均匀,搅拌转速50r/m,均匀混合30min,并加水使混合料湿度为35%左右,得到菌湿粉;将菌湿粉匀速投入制粒机内,调节粒度为40目,然后进行包衣干燥,并加入包被剂溶液,使菌粉形成包衣膜层,过筛获得复合菌益生菌剂。

[0066] 所述包被剂溶液制备:玉米淀粉2-5%、聚甘油脂肪酸酯1-5%、聚乙烯吡咯烷酮1-3%、羟乙基纤维素2-4%、果胶0.1-3%、瓜尔胶0.5-7%、β-环糊精1-10%、低聚麦芽糖1-10%、甘露低聚糖1-10%,余量为水。

[0067] 实施例4哺乳仔猪试验

[0068] 选12头分娩母猪,随机分为两组,并以分娩母猪所产仔猪为试验对象。分为对照组和试验组,试验组使用实施例3制得的复合微生态制剂,凝结芽孢杆菌 $\geq 4.5 \times 10^{10}$ CFU/g、粪肠球菌 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,酿酒酵母菌 $\geq 4.0 \times 10^9$ CFU/g)。试验组将复合益生菌剂溶解于无菌水中,用于试验,总活菌数 $\geq 5.0 \times 10^{10}$ cfu/mL。试验组仔猪在吃初乳前分别灌服2mL实施例3制得的复合益生菌剂水溶液(100g复合微生态制剂/1吨水),对照组仔猪则灌服2mL生理盐水。以后在7d和14d时再次以同样剂量灌服。仔猪出生时称初重,28d断奶时再次称重,记录数据进行分析,期间观察仔猪腹泻及死亡情况。

[0069] 表1复合益生菌剂对哺乳仔猪体重的影响

	组别	仔猪数/头	出生初重/kg	28d 断奶猪重/kg	平均增重/kg
[0070]	对照组	27	1.42±0.13 ^a	7.67±1.46 ^a	6.25±1.33 ^a
	试验组	29	1.37±0.08 ^a	8.94±1.27 ^B	7.57±1.19 ^B

[0071] 注:同列数字肩标小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$),小写字母不同的表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同的表示差异极显著($P < 0.01$)。

[0072] 由表1可见,试验组平均增重高于对照组,比对照组提高了22.72%。。试验组的增重分别与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。试验数据显示,本发明实施例3制得的复合益生菌剂可有效提高哺乳期仔猪的体重。

[0073] 表2复合益生菌剂对哺乳仔猪腹泻及死亡率的影响

	组别	仔猪数	腹泻日龄	腹泻头数	腹泻总数	腹泻率/%	死亡数	死亡率/%
[0074]	对照组	27	3	4	14	1.85%	1	3.70%
			5	7				
			9	3				
	实验组 1	29	9	2	2	0.25%	0	0%

[0075] 由表2可见,哺乳期仔猪腹泻主要出现在一周左右。试验组的腹泻率比对照组降低了86.49%。复合益生菌对于仔猪死亡率的影响,试验组未出现死亡的情况,对照组死亡1头。实验组死亡率比对照组提高3.7%。实验结果显示,实施例3制得的复合益生菌剂可有效降低哺乳期仔猪的腹泻率和死亡率。

[0076] 实施例5仔猪试验

[0077] 试验选用 28 ± 2 日龄同胎次、体重相近(杜×长×大)三元杂交断奶仔猪(公母各半)200头,随机分成五个处理组(对照组、试验组1~3和抗生素组),每处理4个重复,每重复10头,在同等饲养环境下进行饲养试验。对照组为基础日粮,试验组1~3组是分别在对照组基础上添加150克/吨、250克/吨、350克/吨实施例3制得的复合益生菌剂,抗生素组是在对照组基础上添加500克/吨金霉素。试验猪采用封闭式圈舍,日喂4次,自由采食和饮水,日清扫圈舍3次。饲养管理及其免疫程序与猪场日常管理相同,定期消毒,发现猪只生病及时治

疗。试验预饲期5d,正饲期30d,每日记录每栏猪的耗料量,统计采食量;记录初始个体重、结束个体重;观察并记录仔猪的腹泻、粪便状态、皮毛色泽。试验当天早晨空腹称重,每天精确记录4次投料量和剩料量,试验结束后,次日清晨空腹称重;以圈为单位详细记录耗料量;记录各组腹泻发生情况;计算平均日采食量、平均日增重、料重比和腹泻率;观察猪的精神状态和肤色。试验结束时,收集仔猪新鲜粪便,保存于-70℃超低温冰箱中,测定其中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及乳酸菌的含量。

[0078] 表3复合益生菌剂对仔猪生产性能的影响

	组别	仔猪数	耗料/kg	平均增重/kg	试验时间/天	平均日增重	料肉比
	对照组	40	1037.85	14.12±1.20 ^a	30	0.45±0.03 ^a	1.92:1 ^a
[0079]	抗生素组	40	1047.32	15.46±1.42 ^a	30	0.51±0.05 ^a	1.71:1 ^b
	试验组 1	40	1048.51	15.43±1.53 ^a	30	0.52±0.06 ^a	1.68:1 ^b
	试验组 2	40	1052.41	15.47±1.38 ^a	30	0.50±0.04 ^a	1.75:1 ^b
	试验组 3	40	1055.19	15.54±2.04 ^a	30	0.51±0.07 ^a	1.72:1 ^b

[0080] 注:同列数字肩标小写字母相同表示差异不显著(P>0.05),小写字母不相同表示差异显著(P<0.05)。表中数据为均值±标准差。

[0081] 由表3可知,抗生素组和试验组仔猪耗料情况、平均增重、平均日增重均明显高于对照组。抗生素组和试验组1~3的平均增重比对照组分别提高了9.49%、9.27%、9.56%和10.05%。抗生素组和试验组1~3的料肉比比对照组分别降低了10.94%、12.5%、8.85%和10.42%,。抗生素组和试验组1~3组的料肉比显著低于对照组(P<0.05),分别对照组降低了0.21、0.24、0.17、0.2。试验结果表明,本发明的复合益生菌剂可提高仔猪采食量、日增重和饲料转化率。

[0082] 表4复合益生菌剂对仔猪腹泻率的影响

	组别	试验头数	腹泻头数	腹泻次数	腹泻率
	对照组	40	11	17	15.58%
[0083]	抗生素组	40	4	12	4%
	试验组 1	40	5	14	5.83%
	试验组 2	40	4	12	4%
	试验组 3	40	4	11	3.67%

[0084] 由表4可以看出,抗生素组和试验组腹泻率均明显低于对照组,分别比对照组降低了11.58%、9.75%、11.58%和11.91%。试验结束后,通过观察猪的健康活力情况,复合微

生态制剂组的猪皮毛红亮,精神状态好。试验结果表明本发明实施例制得的复合益生菌剂可有效降低断奶仔猪的腹泻率,并有效改善仔猪的生长状态。

[0085] 表5仔猪粪便中不同微生物的含量

组别	大肠杆菌 cfu/g	金黄色葡萄球菌	乳酸菌
对照组	6.89×10^6	7.44×10^6	3.22×10^8
抗生素组	2.34×10^6	3.54×10^5	2.78×10^6
试验组 1	3.56×10^6	2.27×10^6	6.45×10^8
试验组 2	3.02×10^6	4.85×10^5	1.24×10^9
试验组 3	2.37×10^6	3.79×10^5	2.21×10^9

[0087] 由表5可知,仔猪粪便中大肠杆菌含量基本稳定,均可达 10^6 cfu/g,抗生素组和试验组的含量均低于对照组;仔猪粪便中金黄色葡萄球菌含量试验组和抗生素组均比对照组低,其中试验组3最低,活菌数仅有 10^5 cfu/g,其次为抗生素组、试验组3、试验组1较低,活菌数为 10^6 cfu/g;而粪便中乳酸菌的含量试验组3最高,活菌数可达 2.21×10^9 cfu/g,其次为试验组2和试验组1,抗生素组最低。

[0088] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。