



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101273757 B

(45) 授权公告日 2011.02.09

(21) 申请号 200810103056.4

(22) 申请日 2008.03.31

(73) 专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区板井曙光花园中路9号

(72) 发明人 张董燕 季海峰 王四新 黄建国  
单达聪 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.

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1223865 A, 1999.07.28, 全文.

CN 1511945 A, 2004.07.14, 全文.

张英华. 乳酸菌冷冻干燥保护剂的筛选及加

速储存稳定性试验. 《中国乳品工业》. 2007, 第35卷(第2期), 8-10, 26.

刘丹等. 瑞士乳杆菌冷冻干燥保护剂的研究. 《食品科学》. 2006, 第27卷(第9期), 73-75.

黄沧海等. 仔猪源罗氏乳酸杆菌生物学特性的研究. 《云南农业大学学报》. 2004, 第19卷(第6期), 722-726.

吕加平等. 乳酸菌发酵剂冻干保护剂筛选及应用的研究. 《东北农业大学学报》. 1998, 第29卷(第4期), 371-379.

审查员 朱洪杰

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及“罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂及其制备方法”,属微生物饲料制剂添加剂。罗伊氏乳酸杆菌(Lactobacillus reuteri)冻干制剂,其特征在于冻干制剂中的保护剂的重量百分比为:蔗糖1%、脱脂乳12%、乳糖4%、甘油1%、淀粉2%,其余为水。本发明涉及的罗伊氏乳酸杆菌分离于北京油鸡盲肠黏膜,经中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)鉴定为罗伊氏乳酸杆菌,本发明先将该菌株进行发酵扩大,然后进行冷冻干燥,其冷冻干燥制剂的活菌数达到 $10^{10}$ cfu/g,可以直接饲喂动物,最后通过动物安全性实验以及动物饲养实验证明了该菌株具有较高的安全性和功能性。

1. 罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 冻干制剂,其特征在于冻干制剂中的保护剂的重量百分比为:脱脂乳 12%、蔗糖 1%、乳糖 4%、甘油 1%、淀粉 2%,其余为水。

2. 根据权利要求 1 所述的罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂,所述罗伊氏乳酸杆菌活菌数  $\geq 10^{10}$ cfu/g。

3. 根据权利要求 1 所述的罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂,所述罗伊氏乳酸杆菌来源于北京油鸡盲肠黏膜。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂的制备方法,将罗伊氏乳酸杆菌液体发酵扩繁,将发酵液 6000rpm 离心 10min 取菌泥,将菌泥加入到有保护剂的磷酸盐缓冲液中,冻干即可,所述磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.5 ~ 6.7。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,所述发酵工艺参数为:培养基为改良的 MRS 液体培养基;接种量为 10%;发酵温度为 37℃;pH 为 6.4 ~ 6.5;消泡剂为 PDA+ 有机硅;转速为 100rpm;发酵时间为 24h,所述改良的 MRS 液体培养基的碳源以菊粉替代部分葡萄糖,它们占液体培养基的重量比分别为菊粉 3%,葡萄糖 1.7%,所述菊粉中单糖含量百分比为 10%。

6. 根据权利要求 1-3 任一所述的罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂在动物饲料添加剂中的应用,所述动物为家禽或家畜。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,所述家禽为鸡。

## 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种微生物饲料添加剂及其制备方法,尤其涉及一种含有由罗伊氏乳酸杆菌组成的直接饲喂的活菌冻干制剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 近年来养殖业中存在的问题是长期使用抗生素,结果往往会破坏动物肠道的正常菌群以及药物残留等,这对人类构成潜在的威胁,这些问题也已经危及到人类的安全、食物的安全和农牧业的发展。而以乳酸菌为代表的微生物制剂却能起到与抗生素恰恰相反的作用,它能够扶持动物肠道内有益菌的生长和繁殖,从而抑制有害菌的生长,最终达到维持肠道微生态平衡的作用。

[0003] 乳酸杆菌在自然界中分布广泛,在动物消化道中为主要优势菌群,如:在猪肠道正常菌群中乳酸杆菌有:嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、短乳酸杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、纤维二糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus cellobiosus*)、发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、唾液乳酸杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)。而鸡肠道中正菌群的乳酸杆菌则有:嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、唾液乳酸杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、乳酸杆菌亚种 (*Lactobacillus spp.*)、卷曲乳酸杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、德氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、格氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 等。

[0004] 罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 是普遍存在于人和动物肠道的有益乳酸杆菌,它属于专性异型乳酸发酵菌,已有研究表明罗伊氏乳酸杆菌可定植于动物肠道内,代谢可产生乳酸、乙酸等物质,有抑制肠道有害菌生长和繁殖的作用。该菌株已经被 (FDA) 和 (AAFCO) 列入安全的饲料级微生物菌种名单之中,我国卫生部公告 2003 年第 3 号公布罗伊氏乳酸杆菌可作为人类保健食品的微生物菌种,但是在 2006 年公布的 5 种可以添加到饲料中的乳酸杆菌菌种中并没有罗伊氏乳酸杆菌。既然罗伊氏乳酸杆菌可作为人类的保健食品,申请人认为同样应该可以作为饲料添加剂供动物食用,以克服抗生素带来的危害。

### 发明内容

[0005] 本发明针对上述领域的不足,提供一种罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂,可以直接饲喂动物。

[0006] 罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 冻干制剂,其特征在于冻干制剂中的保护剂的重量百分比为:脱脂乳 12%、蔗糖 1%、乳糖 4%、甘油 1%、淀粉 2%,其余为水。

[0007] 所述罗伊氏乳酸杆菌活菌数  $\geq 10^{10}$  cfu/g。

[0008] 所述罗伊氏乳酸杆菌来源于北京油鸡盲肠黏膜。

[0009] 上述冻干制剂的制备方法,将罗伊氏乳酸杆菌液体发酵扩繁,将发酵液离心取菌泥,将菌泥加入到有保护剂的磷酸盐缓冲液中,冻干即可,所述磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.5 ~

6.7.

[0010] 所述发酵工艺中所用的培养基为改良的 MRS 液体培养基;接种量为 10%;发酵温度为 37℃;pH 为 6.4~6.5;消泡剂为 PDA+有机硅;转速为 100rpm;发酵时间为 24h,所述改良的 MRS 液体培养基的碳源以菊粉替代部分葡萄糖,它们占液体培养基的重量比分别为菊粉 3%,葡萄糖 1.7%,所述菊粉中单糖重量百分比为 10%。

[0011] 上述冻干制剂在动物饲料添加剂中的应用。

[0012] 所述动物为家禽或家畜。

[0013] 所述家禽为鸡。

[0014] 本发明从北京油鸡盲肠黏膜上分离得到一株乳酸杆菌,经中国工业微生物菌种保藏管理中心鉴定为罗伊氏乳酸杆菌,通过抑菌实验证明了该菌株具有较强的抗 k88 型大肠杆菌能力,其对大小鼠的急性毒性试验证明了大、小鼠  $LD_{50} \geq 5000\text{mg/kg}$ 。采用 50L 发酵罐扩大培养,其发酵工艺参数为:培养基:MRS 液体培养基;接种量:10%;发酵温度:37℃;pH:6.4~6.5;消泡剂:PDA+有机硅;转速:100rpm;发酵时间:24h。发酵结束后,离心取菌泥,将菌泥加入到含有保护剂的磷酸盐缓冲液中,保护剂成分为脱脂乳 12%、蔗糖 1%、乳糖 4%、甘油 1%、淀粉 2%,将保护剂乳化,然后冻干。并将该菌株的冻干制剂添加到 AA 肉仔鸡饲料中,进行 42d 的饲养试验,通过肉仔鸡生产性能、盲肠微生物和小肠绒毛结构证明了该菌株在动物生产中的实用性。

#### 附图说明

[0015] 图 1 添加菊粉后罗伊氏乳酸杆菌生长  $OD_{600\text{nm}}$  值

[0016] 图 2 添加菊粉后罗伊氏乳酸杆菌 pH 值

[0017] 图 3 50L 发酵罐不同时间对罗伊氏乳酸杆菌生长  $OD_{600\text{nm}}$  值和 pH 值的影响

[0018] 图 4 不同保护剂对罗伊氏乳酸杆菌存活率的影响

[0019] 图 5 冻干制剂对肉仔鸡日增重的影响

[0020] 图 6 冻干制剂对肉仔鸡盲肠黏膜和粪中乳酸菌与大肠杆菌的影响

[0021] 图 7 小肠绒毛结构电镜观察结果

[0022] 其中 A 为对照组, B 为抗生素组, C 为冻干制剂组

[0023] 具体实施方法,

[0024] 实施例 1 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂

[0025] 1-1 乳酸杆菌的分离鉴定

[0026] 将活鸡剖杀,无菌操作刮取盲肠黏膜 1g,置于盛有 9ml 无菌生理盐水的带有玻璃珠的三角瓶中,充分震荡摇匀,然后吸取 0.5ml 菌液于盛有 4.5ml 无菌生理盐水的试管中,此稀释度为  $10^{-1}$ ,重复以上过程,依次制成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的菌液。选择  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三个稀释度,吸取 0.1ml 菌液分别滴于 MRS 培养基平板上,采用烛缸法 37℃ 培养 24~48h,挑取形态不同的菌落在 MRS 培养基上划线接种做纯培养,而后置于 4℃ 冰箱保存备用。

[0027] 然后挑取纯培养物进行染色,镜检;选取无芽孢革兰氏阳性杆菌进行接触酶、硝酸盐还原、明胶液化等生化实验,以及糖醇发酵试验,结果与《常见细菌系统鉴定手册》、《乳酸细菌分类及实验方法》对照,确定菌种。然后送至中国工业微生物菌种保藏中心进行鉴定检验。

[0028] 中国工业微生物菌种保藏管理中心对该乳酸杆菌为罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 的鉴定结果如下：

[0029]

生理特征	培养温度 (°C)	37°C		需氧性		厌氧
	耐盐性	ND		柠檬酸		ND
生化特征	氧化酶	—	接触酶	—	吲哚	—
	硝酸盐还原	ND	七叶灵水解	—	明胶液化	—
	甘露醇	—	水杨苷	—	山梨醇	—
	葡萄糖产气	ND	葡萄糖	+	果糖	+
	苦杏仁苷	+	乳糖	+	麦芽糖	+
	蔗糖	+	甘露糖	—	棉籽糖	+
	鼠李糖	—	阿拉伯糖	+	海藻糖	—
	山梨糖	—	纤维二糖	—	核糖	+
	木糖	—	松三糖	—	肝糖	ND

[0030] 注：表中“+”表示≥90%菌株阳性，“-”表示≥90%菌株阴性，“ND”表示未测定。

[0031] 1-2 罗伊氏乳酸杆菌的抑菌性能测定

[0032] 将罗伊氏乳酸杆菌和大肠杆菌分别在各自适宜的培养基内繁殖，传 1 代。取 20h 培养物，调整菌的浓度为  $10^7$  cfu/ml。

[0033] (1) 取 MRS 液体培养基 4ml 的试管 4 支，分别接种乳酸杆菌 0.1ml，同时接种大肠杆菌 0.1ml，置恒温培养箱 37°C 培养。取培养物 24、48、72、96、120h 的培养液倒麦康凯琼脂平板，检查大肠杆菌存活情况，记录活菌数。

[0034] (2) 取 MRS 液体培养基 4ml 的试管 4 支，分别接种乳酸杆菌 0.1ml，培养 24h 后，接种大肠杆菌 0.1ml，置恒温培养箱 37°C 再培养。取大肠杆菌单独管作为对照，取培养物 24、48、72、96、120h 的培养液倒麦康凯琼脂平板，检查大肠杆菌拮抗情况，记录活菌数。

[0035] (3) 取 MRS 液体培养基 4ml 的试管 4 支，接种大肠杆菌 0.1ml，培养 24h 后，接种乳酸杆菌 0.1ml，置恒温培养箱 37°C 再培养。取培养物 24、48、72、96、120h 的培养液倒麦康凯琼脂平板，检查大肠杆菌拮抗情况，记录活菌数。

[0036] 该菌株的抑菌性能测定结果为：在罗伊氏乳酸杆菌与大肠杆菌共同培养和先接种罗伊氏乳酸杆菌 24h 后接种大肠杆菌的情况下，大肠杆菌活菌数很低；在大肠杆菌接种 24h 后接种罗伊氏乳酸杆菌，72h 后大肠杆菌全部失活。

[0037] 1-3 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂的制备

[0038] 1-3-1 罗伊氏乳酸杆菌 50L 发酵罐扩大培养

[0039] 1-3-1-1. 罗伊氏乳酸杆菌培养基的优化

[0040] 1-3-1-1-1 材料

[0041] 菊粉：单糖比例为 10%。

[0042] 1-3-1-1-2 方法

[0043] 改变原有培养基 (MRS) 的碳源成分, 以菊粉替代部分葡萄糖, 使培养基碳源占 2%, 菊粉中单糖含量为 10%。共分为 4 组: I 组菊粉 1%, 葡萄糖 1.9%; II 组菊粉 2%, 葡萄糖 1.8%; III 组菊粉 3%, 葡萄糖 1.7%; IV 组菊粉 4%, 葡萄糖 1.6%。采用封口静置培养条件, 测定菌株生长  $OD_{600nm}$  值和 pH 值。见表 1、图 1、图 2。

[0044] 表 1 添加菊粉后罗伊氏乳酸杆菌生长  $OD_{600nm}$  值和 pH 值

[0045]

培养时间 (h)	I 组 (1% 菊粉)		II 组 (2% 菊粉)		III 组 (3% 菊粉)		IV 组 (4% 菊粉)	
	$OD_{600nm}$	PH	$OD_{600nm}$	pH	$OD_{600nm}$	pH	$OD_{600nm}$	pH
0	0.913±	5.77±	0.906±	5.67±	0.962±	5.81±	0.903±	5.95±
	0.075	0.11	0.097	0.05	0.036	0.16	0.073	0.07
4	1.059±	5.28±	0.993±	5.14±	1.245±	5.41±	0.971±	5.62±
	0.008	0.04	0.062	0.05	0.048	0.05	0.047	0.18
8	1.473±	4.87±	1.128±	5.00±	1.666±	5.37±	1.146±	5.48±
	0.176	0.07	0.052	0.14	0.096	0.02	0.083	0.12
12	1.759±	4.67±	1.418±	4.78±	2.059±	4.79±	1.543±	5.04±
	0.090	0.08	0.034	0.17	0.053	0.07	0.178	0.03

[0046]

16	2.219±	4.30±	1.804±	4.64±	2.402±	4.20±	2.050±	4.90±
	0.170	0.08	0.239	0.08	0.162	0.02	0.092	0.12
20	2.481±	4.15±	2.300±	4.35±	2.790±	4.13±	2.525±	4.56±
	0.076	0.09	0.099	0.12	0.083	0.10	0.064	0.24
24	2.673±	3.88±	2.454±	4.19±	2.925±	3.60±	2.761±	4.07±
	0.093	0.12	0.086	0.14	0.057	0.10	0.175	0.04
28	2.712±	3.74±	2.544±	3.87±	2.937±	3.52±	2.802±	3.65±
	0.043	0.10	0.013	0.17	0.052	0.13	0.146	0.07
32	2.711±	3.51±	2.500±	3.68±	2.935±	3.38±	2.825±	3.57±
	0.048	0.04	0.097	0.12	0.066	0.12	0.104	0.08
36	2.657±	3.50±	2.518±	3.65±	2.897±	3.41±	2.739±	3.43±
	0.054	0.05	0.060	0.18	0.099	0.10	0.093	0.01
40	2.604±	3.51±	2.532±	3.60±	2.900±	3.37±	2.767±	3.55±
	0.094	0.16	0.079	0.09	0.048	0.10	0.103	0.09
44	2.604±	3.42±	2.442±	3.71±	2.885±	3.43±	2.670±	3.45±
	0.082	0.04	0.083	0.08	0.105	0.11	0.165	0.09
48	2.589±	3.44±	2.457±	3.64±	2.860±	3.37±	2.581±	3.44±
	0.060	0.08	0.023	0.20	0.178	0.08	0.069	0.08
52	2.542±	3.45±	2.440±	3.62±	2.871±	3.40±	2.517±	3.37±
	0.114	0.10	0.190	0.02	0.150	0.03	0.218	0.02

[0047] 注：表中数据为：均值 ± 标准差。

[0048] 结果如下：

[0049] 在培养基中添加菊粉后，能不同程度的增加菌液的 OD<sub>600nm</sub> 值，其中效果最好的为 3% 菊粉添加量。

[0050] 1-3-1-2 发酵罐扩大培养

[0051] 1-3-1-2-1. 材料

[0052] 上述改良的 MRS 液体培养基。

[0053] 1-3-1-2-2 方法

[0054] 本试验根据所用菌种最适温度为 37℃，因此控制发酵罐温度为 37℃，发酵培养基采用改良的 MRS 培养基，接种量为 10%，装液量为 50%，转速为 100r/min，消泡剂为 PDA 0.10% + 有机硅 0.02%，最初 pH6.4 ~ 6.5，自始至终维持罐压在 0.08MPa。分别在发酵的第 7, 11, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31h 取适量菌液测定其 OD<sub>600nm</sub> 值和 pH 值，记录罗伊氏乳酸杆菌生长情况。见表 2、图 3。

[0055] 表 2 50L 发酵罐不同时间对罗伊氏乳酸杆菌生长 OD<sub>600nm</sub> 值和 pH 值的影响

[0056]

时间 h	7	11	15	19	21	23	25	27	29	31
OD <sub>600nm</sub> 值	1.891	2.150	2.396	2.445	2.459	2.502	2.459	2.452	2.454	2.202
pH 值	5.81	5.62	5.04	4.90	4.86	4.83	4.82	4.80	4.79	4.78

[0057] 试验结果表明：在发酵的 20h 后，罗伊氏乳酸杆菌开始平稳生长，进入稳定期，在 23h 时 OD<sub>600nm</sub> 值达到最高值，为 2.502，本发明在其 OD<sub>600nm</sub> 值达到最高之后收取发酵液，因此确定 24h 为发酵结束时间。

[0058] 1-3-2 乳酸杆菌冻干制剂的工艺研究

[0059] 1-3-2-1 冻干保护剂的优选

[0060] 乳酸菌在冻干过程中不可避免地会造成部分细胞的损伤、死亡及某些酶蛋白分子的钝化，这对生产非常不利。若在冻干前加入适当的保护剂则可以减轻或防止冷冻和干燥两个过程对细胞的损害，使得乳酸菌尽可能保持原有的各种生理生化特性和生物活性。然而，乳酸菌具有种属特异性，即使在相同的外部条件下，同种菌的不同菌株在冻干过程中也可能表现出不同的特性。因此，根据菌种的特性选择适宜的保护剂在冻干过程中起着至关重要的作用。

[0061] 1-3-2-1-1 材料

[0062] 脱脂乳、蔗糖、甘油、乳糖等作为冻干保护剂。

[0063] 1-3-2-1-2 冻干制剂的制备方法

[0064] 罗伊氏乳酸杆菌发酵培养 20h 后，收取发酵液 6000rpm 离心 10min 取菌泥，加入不同组合的保护剂，制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液。将菌悬液倒入冻干机的物料干燥盘中，置于超低温冰箱中急速冷冻，以保证形成小的冰晶和冻结完全，预冻同时打开冷冻干燥机，当机器达到第二级制冷时，将物料干燥盘放入冻干机中，抽真空开始进行冻干。确定最佳保护剂。见表 3、图 4。

[0065] 表 3 不同保护剂对罗伊氏乳酸杆菌存活率的影响

	组别	保护剂配方	存活率 (%)
[0066]	1	10%脱脂奶粉+1%甘油	95.98
	2	10%脱脂奶粉+1%蔗糖+1%甘油	82.57
	3	18%脱脂奶粉	46.13
	4	18%脱脂奶粉+1%蔗糖+1%甘油+2%淀粉	96.64



	5	18%脱脂奶粉+2%淀粉;	70.74
	6	18%脱脂奶粉+1%蔗糖+2%淀粉	70.90
	7	12%脱脂奶粉+1%蔗糖+1%甘油+4%乳糖+ 2%淀粉	97.26
	8	18%脱脂奶粉+10%乳糖	67.82
	9	18%脱脂奶粉+10%乳糖+0.3%酵母浸粉	44.79
	10	18%脱脂奶粉+10%乳糖+5%蛋白胨	48.81
[0067]	11	18%脱脂奶粉+3%麦芽糖+2%葡萄糖	74.22
	12	18%脱脂奶粉+1%蔗糖+1%甘油+3%膨化玉 米	72.39
	13	12%脱脂奶粉+1%海藻酸钠	93.58
	14	12%脱脂奶粉+0.5%海藻酸钠	56.06
	15	12%脱脂奶粉+0.5%海藻酸钠+3%乳糖	67.16
		12%脱脂奶粉+1%海藻酸钠+5%乳糖	90.92

[0068] 计数培养基为:葡萄糖 17.0g,菊粉 30.0g,蛋白胨 10.0g,牛肉膏 10.0g,酵母膏 5.0g,三水合乙酸钠 5.0g,柠檬酸二氨 2.0g,吐温(Tween)80 1.0mL,  $K_2HPO_4$  2.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.58g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.19g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL, pH 为 6.5, 121℃灭菌 15min。

[0069] 结果表明:当保护剂组合为 12%脱脂奶粉、1%蔗糖、4%乳糖、1%甘油、2%淀粉时,罗伊氏乳酸杆菌的存活率达到 97.26%,因此,确定此为最佳冻干保护剂。

[0070] 1-3-2-2 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂的制备

[0071] 罗伊氏乳酸杆菌采用 50L 发酵罐扩大培养,发酵罐工作参数分别为:发酵罐温度为 37℃,培养基采用 MRS 培养基,接种量 10%,装液量为 50%,转速为 100r/min,消泡剂为 PDA 0.10% + 有机硅 0.02%,最初 pH6.4 ~ 6.5,自始至终维持罐压在 0.08MPa。发酵培养 20h 后,收取发酵液 6000rpm 离心 10min 取菌泥,将菌泥加入到含有保护剂的磷酸盐缓冲液中 (pH = 6.6),保护剂的组成为 12%脱脂乳、1%蔗糖、4%乳糖、1%甘油、2%淀粉,制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液。将菌悬液倒入冻干机的物料干燥盘中,置于超低温冰箱中急速冷冻,以保证形成小的冰晶和冻结完全,预冻同时打开冷冻干燥机,当机器达到第二级制冷时,将物料干燥盘放入冻干机中,抽真空开始进行冻干。冻干后即得罗伊氏乳酸杆菌冻干产品,测定后活菌数为  $5.2 \times 10^{10}$  cfu/g。

[0072] 1-3-3 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂的安全性能测定

[0073] 将罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂送至国家指定检测中心进行了大、小鼠急性毒性  $LD_{50}$  实验,结果证明了大、小鼠  $LD_{50}$  均大于 5000mg/kg,证明了该罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂属安全性饲料添加剂。

[0074] 实施例 2 罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂在肉仔鸡生产中的应用效果

[0075] 1. 将冻干制剂按不同添加比例关系添加到 AA 肉仔鸡饲料中,试验分为空白组、抗生素组和 0.3%冻干制剂组,分别在 21 日龄末和 42 日龄末测定肉仔鸡平均日增重。在 21 日龄末和 42 日龄末,与空白组和抗生素组相比,添加罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂组能够提高

肉仔鸡平均日增重。表 4、图 5。

[0076] 表 4 添加制剂组对肉仔鸡日增重的影响

[0077]

组别	0 ~ 3W	4 ~ 6W	全期 (0 ~ 6W)
空白组	31.14±0.45	77.85±0.14	55.04±0.70
抗生素组	31.92±0.01	79.55±0.08	56.29±0.45
菌组	32.49±0.41	82.77±0.12	58.22±0.61

[0078] 结果显示：与空白组和抗生组相比，试验组添加罗伊氏冻干制剂能提高肉仔鸡日增重，但差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

[0079] 2. 饲养 42d 结束后分别从空白组、抗生素组和添加冻干制剂组随机抽取 2 只鸡进行屠宰，颈静脉采血后，放血处死湿法拔毛。取两侧盲肠，用细线扎口，屠宰试验结束后立即于超净工作台中刮取盲肠黏膜和粪便各 1g，加入无菌生理盐水 99ml，加入玻璃珠震荡摇匀，此为  $10^{-2}$ ，依次进行稀释，制成  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  的菌悬液。分别选择  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  三个稀释度吸取 0.1ml 涂布接种于 MRS 培养基平皿上（各稀释度设 3 个重复），烛缸法 37℃ 培养 24 小时后，选取乳白色，稍偏黄，表面光滑，凸起，边缘整齐不透明，质地软，直径 0.6 ~ 2.7mm 的菌落进行计数，并进一步作生化鉴定；同时选择  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  三个稀释度吸取 0.1ml 涂布接种于普通肉汤培养基平皿上（各稀释度设 3 个重复），置 37℃ 培养箱中培养 24 小时后，选取灰色，表面光滑、湿润、凸起，边缘整齐不透明，质地软、粘、直径 1.0 ~ 3.0mm 的菌落进行计数，并进一步作生化鉴定。

[0080] 表 5 日粮中添加冻干制剂对肉鸡盲肠黏膜和粪中乳酸菌与大肠杆菌的影响

[0081]

组别	盲肠黏膜		粪	
	乳酸菌	大肠杆菌	乳酸菌	大肠杆菌
I 组	8.76±0.24 <sup>1a</sup>	7.08±0.72	9.83±0.33	7.36±0.23
II 组	9.68±0.17 <sup>2b</sup>	7.43±0.13	10.45±0.25	7.22±0.57
III 组	9.87±0.31 <sup>3c</sup>	7.52±0.32	10.40±0.17	7.00±0.10

[0082] 注：a. 同列肩标无相同大写字母者差异极显著 ( $P < 0.01$ )，同列肩标无相同小写字母者差异显著 ( $P < 0.05$ )，同列不标任何字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )；b. 表中数据为每克盲肠黏液或粪中乳酸菌与大肠杆菌含量的对数值。

[0083] 结果表明，日粮中添加罗伊氏乳酸杆菌冻干制剂能使盲肠黏膜上乳酸菌数量显著增加 ( $p < 0.05$ )。表 5、图 6。

[0084] 3. 取抗生素组和添加冻干制剂组肉仔鸡的十二指肠 1mm<sup>3</sup> 左右，用缓冲液冲洗干净后，放置 2.5% 戊二醛溶液中，送至中国农大电镜实验室进行处理观察。

[0085] 通过电镜观察，抗生素小肠绒毛显得比较凌乱，而添加冻干制剂组的小肠绒毛比

较整齐。见图 7。

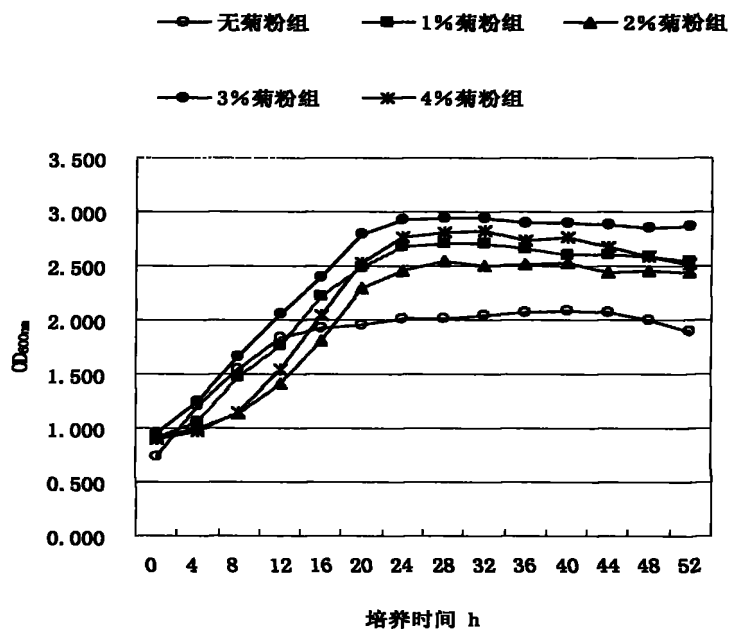


图 1

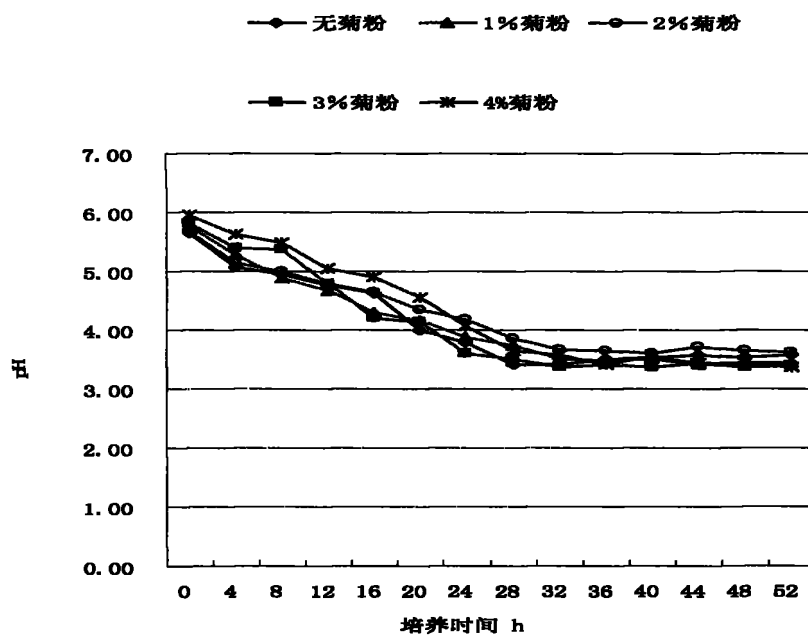


图 2

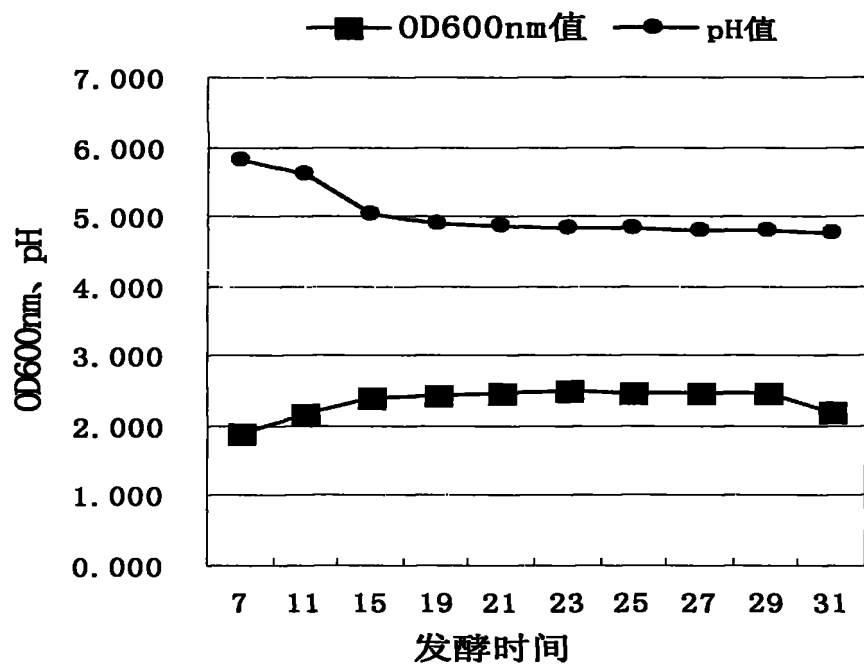


图 3

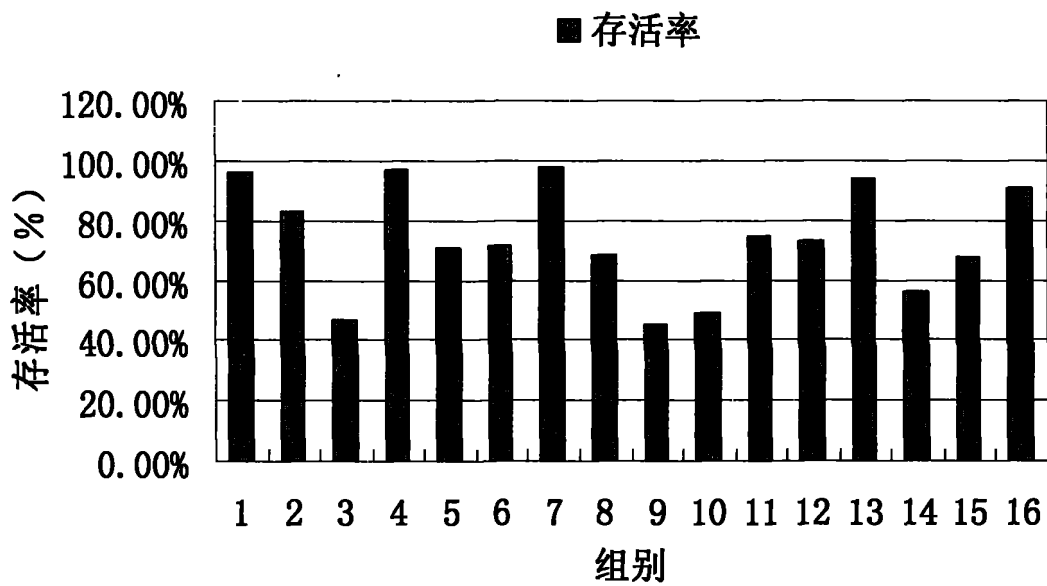


图 4

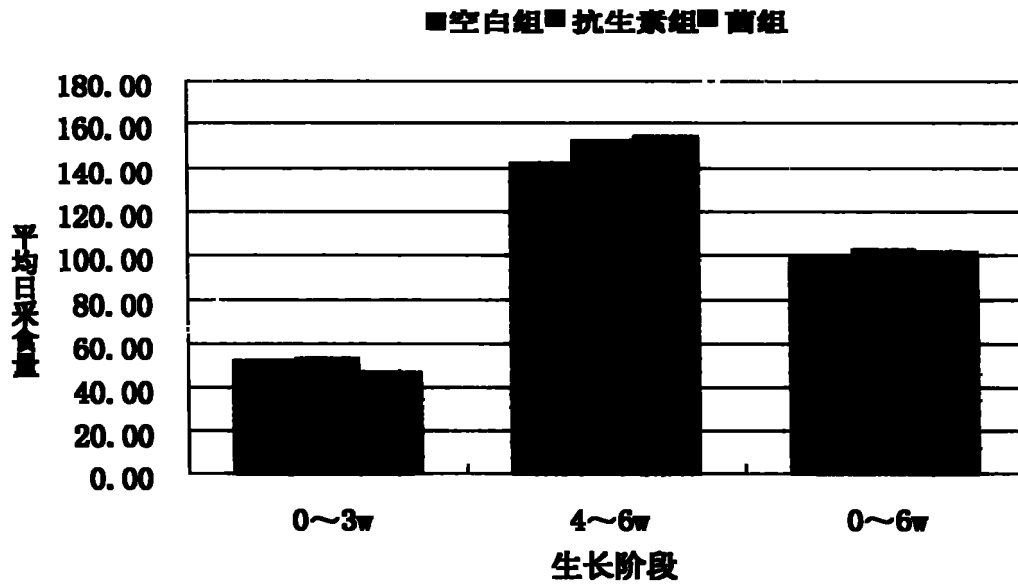


图 5

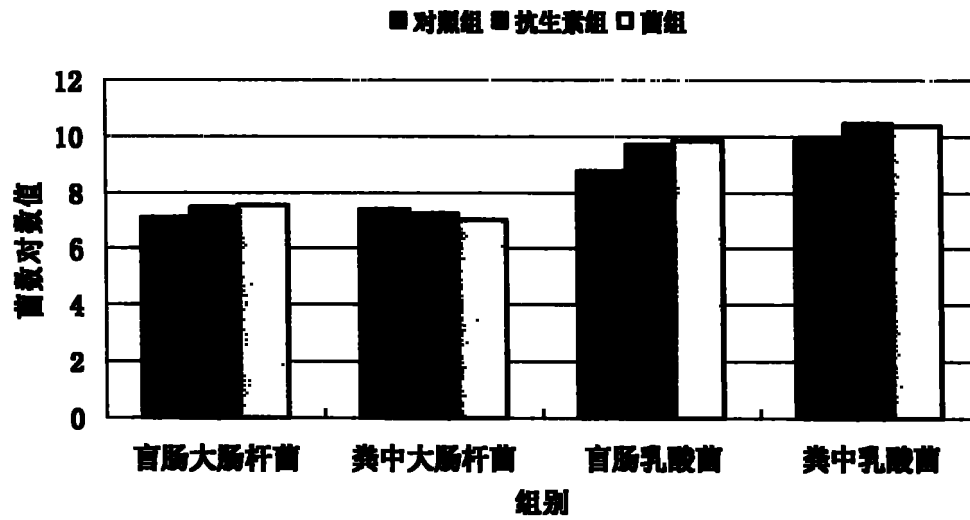


图 6

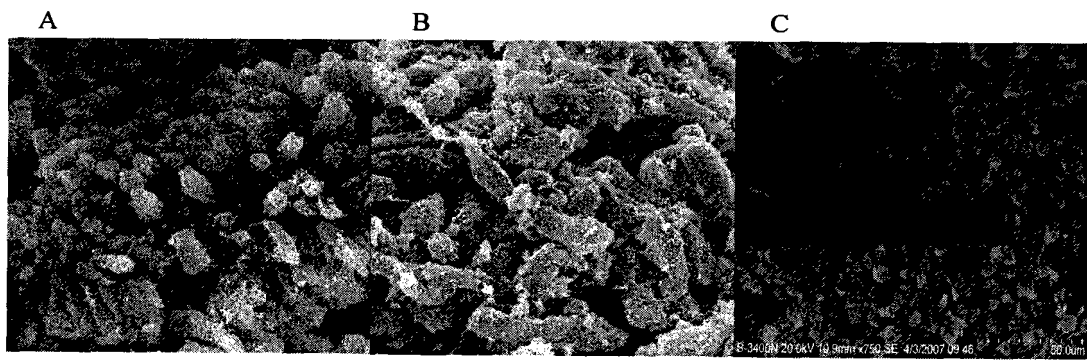


图 7