



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102517227 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201110378223. 8

(22) 申请日 2011. 11. 24

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5092 2011. 07. 26

(73) 专利权人 北京大北农业科技集团股份有限公司

地址 100080 北京市海淀区中关村大街 27 号中关村大厦 14 层大北农集团

专利权人 内蒙古四季春饲料有限公司
北京科高大北农饲料有限责任公司

(72) 发明人 杜建涛 付维来 刘婷 王安如
王丽英 王松

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

C12R 1/46 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102031235 A, 2011. 04. 27, 全文, 尤其是说明书第 29-34 段, 以及实施例 1-6.

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

粪肠球菌及其应用与其饲料添加剂和发酵剂

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域, 涉及一株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 及其应用与其饲料添加剂和发酵剂。本发明的粪肠球菌具有良好的抗逆性功能和益生功能: 可以在保护剂保护下对其进行高温干燥、也可耐受 90℃ 制粒温度; 对大肠杆菌 k88、k99 和金黄葡萄球菌有较强的抑制作用, 产酸和纤维素酶的能力很强, 可以降低 pH 值和分解一些纤维素。用本发明的粪肠球菌制备的生物饲料添加剂在禽畜、水产养殖中可以替代部分抗生素, 减少抗生素的使用, 提高动物的免疫力, 提高饲料的转化率, 提高养殖效益。本发明的粪肠球菌也可用于豆粕、棉粕、青草等的发酵, 可以有效防止饲料霉变, 提高饲料中营养的利用率。

1. 一株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*), 保藏编号为 CGMCC No. 5092。
2. 如权利要求 1 所述的粪肠球菌, 其特征在于该菌 16sRNA 基因序列如 SEQ ID No :1 所示。
3. 权利要求 1 所述的粪肠球菌在制备饲料添加剂中的应用。
4. 如权利要求 3 所述的粪肠球菌在制备饲料添加剂中的应用, 其特征在于所述的饲料添加剂主要应用于禽畜或水产养殖饲料中, 饲料中粪肠球菌的活菌数为 10^6-10^8 cfu/g。
5. 一种包含权利要求 1 所述的粪肠球菌的饲料添加剂, 其特征在于饲料添加剂中粪肠球菌的活菌数为 10^9-10^{10} cfu/g。
6. 权利要求 1 所述的粪肠球菌在制备发酵剂中的应用。
7. 如权利要求 6 所述的粪肠球菌在制备发酵剂中的应用, 其特征在于所述的发酵剂为用于豆粕、棉粕、青草和 / 或玉米秸秆的发酵剂, 发酵剂加入豆粕、棉粕、青草和 / 或玉米秸秆后的活菌数为 10^6-10^7 cfu/g。
8. 一种包含权利要求 1 所述的粪肠球菌的发酵剂, 其特征在于发酵剂中粪肠球菌的活菌数为 10^8-10^{10} cfu/g。

粪肠球菌及其应用与其饲料添加剂和发酵剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 及其应用与其饲料添加剂和发酵剂。

背景技术

[0002] 在我国养殖业中,抗生素的过度使用,造成了药物残留以及大量耐药性细菌产生,其结果严重阻碍了畜、禽、水产养殖业的健康持续发展,为食品安全和消费者的身体健康埋下了隐患,因此寻找安全、无残留的抗生素替代品迫在眉睫。包含益生菌的生物饲料添加剂是一种十分理想的部分抗生素的替代品,而益生菌菌株是开发质量稳定、效果显著、性价比高的生物饲料添加剂的重要基础。益生菌的研究和开发的关键问题在于优良菌株的分离和筛选、良好的益生菌处理工艺。目前,益生菌菌种存在以下几个问题:1. 大多数的益生菌为不产芽孢的乳酸菌,且多属专性厌氧菌,极易受到温度、氧气、水分及酸碱等外界环境因素的影响,通常菌活性保持比较困难;2. 多数益生菌在饲料加工过程中难以耐受饲料制粒时的高温;3. 菌种本身的特性不好,产酶、抑菌能力差。

发明内容:

[0003] 本发明的目的在于提供一株抗逆性强、益生功能优秀的益生菌——粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*),保藏编号为 CGMCC No. 5092,此菌具有良好的抗逆性功能和益生功能:耐人工胃酸、耐胆汁液、耐高温、对大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌有较强抑制作用,产酸能力较强、能够抑制霉菌。

[0004] 本发明的另一个目的是提供了该粪肠球菌的应用。

[0005] 本发明还提供了包含该粪肠球菌的饲料添加剂和发酵剂。

[0006] 本发明的目的是通过如下技术方案实现的:

[0007] 本发明提供一株粪肠球菌,其保藏编号为 CGMCC No. 5092。

[0008] 其中,该菌的 16s rRNA 基因序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0009] 本发明的粪肠球菌可用于制备饲料添加剂。饲料添加剂主要用于畜、禽或者水产养殖饲料中,如鸡、鸭、猪、牛、羊、鱼等,其中饲料添加剂中粪肠球菌的活菌数为 10^9-10^{10} cfu/g;饲料添加剂添加于禽畜或水产养殖饲料后,饲料中粪肠球菌的活菌数为 10^6-10^8 cfu/g。

[0010] 本发明还提供了包含该粪肠球菌 CGMCC No. 5092 的饲料添加剂,其特征在于饲料添加剂中粪肠球菌的活菌数为 10^9-10^{10} cfu/g。

[0011] 本发明的粪肠球菌也可用于制备发酵剂。

[0012] 其中,所述的发酵剂为用于豆粕、棉粕、青草和 / 或玉米秸秆的发酵剂,发酵剂加入豆粕、棉粕、青草和 / 或玉米秸秆后的活菌数为 10^6-10^7 cfu/g。

[0013] 本发明还提供了包含该粪肠球菌 CGMCC No. 5092 的发酵剂,其特征在于发酵剂中粪肠球菌的活菌数为 10^8-10^{10} cfu/g。

[0014] 本发明的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 为申请人从猪大肠中分离得到,其生物学特征如下:菌落圆整,表面光滑,不透明,乳白色,边缘光滑,革兰氏阳性菌;单个菌体为球状或椭圆状。本发明的粪肠球菌经过人工胃液、胆汁液及耐热性的筛选;又经过产酶能力筛选和抑菌能力筛选,可以耐受 pH2.0,1%胃蛋白酶的人工胃液,可以耐受 0.3%的人工胆汁液,可以耐受 85℃的制粒温度,也可以抑制致病性大肠杆菌 K88, K99 和金黄色葡萄球菌,具有较强的产酸和抑制豆粕、棉粕、玉米秸秆中霉菌的能力。本发明的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 申请人已于 2011 年 7 月 26 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: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,保藏编号为 CGMCC No. 5092。

[0015] 有效效果:

[0016] (1) 本发明的粪肠球菌 CGMCC No. 5092 的抗逆性强,可以耐受制粒高温,耐受人工胃液,人工胆盐,因此在经过饲料制粒,动物胃肠道环境后,还有大量活菌可以顺利进入动物的肠道,在肠道中发挥益生功能,提高动物免疫力,降低养殖成本;

[0017] (2) 本发明的粪肠球菌可以有效抑制动物肠道内常见致病菌大肠杆菌 K88, K99 和金黄色葡萄球菌。

[0018] (3) 本发明的粪肠球菌可以大量的产酸,能够降低肠道内的 pH 抑制有害菌的生长和繁殖,同时也有助于消化。

[0019] (4) 本发明的粪肠球菌经过培养和高密度发酵可作为生物饲料添加剂加到养殖动物的饮水或者饲料中,改善动物肠道健康,提升动物免疫力,增加动物的生产性能。

[0020] (5) 本发明的粪肠球菌还可以作为发酵剂,对豆粕、棉粕、菜粕和 / 或玉米秸秆进行处理,可以抑制霉菌的产生,增加养殖动物对豆粕、棉粕、菜粕或者玉米秸秆中营养成分的吸收。

附图说明

[0021] 图 1:图 1 为粪肠球菌抑制大肠杆菌 K88, K99 和金黄葡萄球菌的抑菌圈图片。

[0022] 图 2:粪肠球菌 (CGMCC No. 5092) 发酵玉米粉的图片

[0023] 通过下列实施例将更具体的说明本发明,但是应理解所述实施例仅是为了说明本发明,而不是以任何方式限制本发明的范围。

具体实施方式:

[0024] 实施例 1 粪肠球菌 CGMCC No. 5092 的筛选。

[0025] 1、初筛

[0026] 取样品猪粪、牛粪和鸡粪等样品各 5g,浸泡于 20ml 无菌 0.85%生理盐水中,震荡打散样品,使样品充分与生理盐水接触,70℃恒温水浴锅静置 3 分钟,取上清,5000rpm 离心 10 分钟,弃去上清。将离心后的菌体沉淀加入 10ml 人工胃液中,37℃静置 2h,然后离心,收集菌体后,将菌体沉淀加入 10ml 人工胆盐中,37℃静置 4h,收集菌体,稀释涂布于 LB 培养基。37℃培养箱培养 12-24h 后,对菌落进行纯化分离。对得到的菌进行保存,并进一步复筛。

[0027] 生理盐水的配制方法是:0.85%氯化钠溶液,高压灭菌后备用。

[0028] 人工胃液的配制方法是：1%胃蛋白酶，0.85%氯化钠，用浓盐酸调 pH 值到 2.0，经细菌过滤器过滤除菌后备用。

[0029] 人工胆盐的配制方法是：在液体肉汤中添加 0.3%的猪胆盐（分析纯），高压灭菌后备用。

[0030] LB 固体培养基的制作方法是：蛋白胨 10g，酵母膏 5g，氯化钠 10g，琼脂 1.5%，pH7.0，高压灭菌后备用。

[0031] 2、复筛

[0032] (1) 将配置好、灭完菌的 LB 培养基温度冷却至 45℃，加入过夜培养的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌（每毫升培养基加入 1 微升菌液），震荡混匀，倒入无菌平板，水平凝固后，每个平板利用四个牛津杯进行打孔，每只牛津杯中加入 200 μl 待测菌液，盖好皿盖，小心移至 37℃培养箱，平皿正放静置培养。培养 20h 后，打开皿盖，移去牛津杯，用卡尺测量抑菌圈直径。

[0033] 实施例 2 粪肠球菌的分子鉴定

[0034] 利用细菌的通用引物对筛选到的菌株进行 PCR 鉴定：按细菌 DNA 提取试剂盒操作说明书提取模板 DNA。使用 16S rRNA 保守序列的上游引物 5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3'，见 SEQ ID No. 2 和下游引物 5'-GGT TACCTT GTT ACG ACT T-3'，见 SEQ ID No. 3 扩增细菌 16s rRNA 基因片段。经过测序得到该菌属于粪肠球菌，扩增片段的测序结果见 SEQ ID No. 1。

[0035] 实施例 3 粪肠球菌抗逆性的验证

[0036] (1) 耐高温性

[0037] 将培养 12h 的粪肠球菌进行离心收集，置入生理盐水中进行重悬后，取样涂布，计活菌数；再将生理盐水在 70℃的水浴锅里加热十分钟后，迅速冷却，再进行平板计数，残存活菌数为 85.3%。

[0038] (2) 人工胃液的耐受性

[0039] 取 0.5ml 培养 12h 粪肠球菌的菌液，溶于 4.5ml 生理盐水中，用平板计数法计活菌数。再取定量上述菌液加入 4.5ml 人工胆盐培养基中，37℃静置 2h，平板计数法计残存活菌数，残存活菌数为 92.2%。

[0040] (3) 人工胆汁液的耐受性

[0041] 取 0.5ml 培养 12h 粪肠球菌的菌液，溶于 4.5ml 生理盐水中，用平板计数法计活菌数。而后另取 0.5ml 上述菌液加入 4.5ml 人工胆汁液培养基中，37℃静置 2h，平板菌落计数法计残存活菌数，残存活菌数为 86.2%。

[0042] 结果：以上几个实验表明，本发明中从猪大肠中分离到的粪肠球菌的抗逆性较强，可以耐受较高的温度，耐受人工胃液，人工胆盐，因此作为饲料添加剂使用，能够保证大量的菌体顺利通过动物的肠道，在肠道中存活，发挥其益生功能。

[0043] 实施例 4 粪肠球菌 (CGMCC No. 5092) 的益生功能

[0044] (1) 抑菌功能验证

[0045] 过夜培养的致病性大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌菌液用平板计数法计数。分别在 3 管 5ml 的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌中加入 5ml 粪肠球菌菌液。37℃培养 4h，平板菌落计数法计算残存的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数。残存致病性大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数为 24.7%、30.2%和 31.8%。

[0046] (2) 在豆粕或者玉米粉中抑制霉菌的验证

[0047] 取培养 12h 的粪肠球菌的菌液 20ml, 与 30g 玉米粉或者豆粕进行均匀混合, 空白实验为 20ml 无菌水与 30g 玉米粉或者豆粕进行均质混合, 然后分别在 3d、5d、8d 和 10d 对两瓶里面的玉米或豆粕及霉菌的生长情况进行观察。通过实验表明, 在 5 天后, 没有加入粪肠球菌菌液的玉米粉和豆粕中均有霉菌丝长出, 而加入粪肠球菌菌液的玉米粉和豆粕的颜色仍然新鲜, 有所分解但无霉菌斑或者霉菌丝的出现。

[0048] 实施例 5 粪肠球菌 (CGMCC No. 592) 饲料添加剂的制备

[0049] (1) 粪肠球菌的高密度发酵

[0050] 发酵粪肠球菌时用的发酵培养基由以下成分组成: 红糖 18g/L, 蛋白胨 4g/L, 牛肉膏 3g/L, 酵母浸粉, 0.8/L, 七水合硫酸镁 0.4g/L, 硫酸锰 0.005g/L, pH 为 7.2。

[0051] 发酵条件为: 发酵温度为 37℃, 发酵时间为 12h, pH 值为 7.2, 转速为 100rpm, 初始接种量为 2%。发酵结束后, 得到 7.3×10^9 cfu/ml 的菌液。

[0052] (2) 粪肠球菌 (CGMCC No. 592) 饲料添加剂的制备

[0053] 对粪肠球菌进行高温喷雾干燥, 其保护剂成分为: 黄原胶, 海藻糖, 麦芽糊精, 进风 180℃, 出风 70℃, 得到流散性好, 易溶于水、活菌数在 4×10^{10} cfu/g 的粪肠球菌菌粉。

[0054] 实施例 6 粪肠球菌 (CGMCC No. 592) 在发酵玉米粉过程中的作用

[0055] 将玉米粉和水以 1 : 0.5 的比例充分混匀, 以 1% 的接种量接种粪肠球菌 CGMCC No. 592 菌粉, 添加量为 10^7 /g, 发酵温度为 37℃, 发酵时间为 3d。发酵容器为 250mL 的锥形瓶, 而后置入培养箱中进行发酵。空白对照为不接种粪肠球菌菌粉的玉米粉与水 (1 : 0.5) 的混合物, 对照 2 为 1% 接种量接种枯草芽孢杆菌菌粉的玉米粉和水 (1 : 0.5) 的混合物。

[0056] 结果: 与空白对照相比, 玉米粉经过粪肠球菌发酵后, 其颜色、粘稠度和风味均明显改善 (图 2), 其中接种粪肠球菌 CGMCC No. 592 的发酵玉米粉和接种枯草芽孢杆菌的发酵玉米粉的颜色、粘稠度和风味改善更为明显。在室温继续放置未发酵玉米粉和发酵玉米粉一周后, 观察到未发酵玉米粉被霉菌污染, 发酵玉米粉未被污染。放置两周后, 枯草芽孢杆菌和粪肠球菌发酵的玉米粉仍然没有被霉菌污染, 但是粪肠球菌发酵的玉米粉其风味更佳, 说明粪肠球菌 CGMCC No. 592 具有防止霉菌感染的功效, 且作用比枯草芽孢杆菌作用更佳。

[0057] 实施例 7 粪肠球菌饲料添加剂对蛋鸡生产性能、蛋品质、死淘率和抗体水平的影响

[0058] 用日龄相同的产蛋后期海兰蛋鸡 9000 只, 分三组, 每幢一组 3000 只, 分三个重复, 每个重复 1000 只。分组情况如下:

[0059] A 组, 空白对照组, 饲喂蛋鸡基础日粮; B 组, 在蛋鸡基础日粮中添加抗生素 (金霉素) 80g/t; C 组, 在蛋鸡基础日粮中添加粪肠球菌饲料添加剂 0.18%。

[0060] 前 7 天为预试期, 后 28 天为试验期, 并按上述分组重复试验 3 次, 测定鸡舍内 NH_3 、 H_2S 浓度、鸡蛋破损率、哈夫单位、产蛋率、蛋重、死淘率、蛋壳光洁度、抗体水平等指标。结果列于表 (1)

[0061] 表 1 对蛋鸡生产性能、蛋白质、死淘率的影响

[0062]

	A 空白对照组	B 抗生素对照组	C 粪肠球菌饲料添加剂组
氨气 (ppm)	16.7	12.7	10.3
硫化氢 (ppm)	8.43	6.78	5.89
鸡蛋破损率 (%)	5.6	4.9	4.8
后期产蛋率 (%)	89.2	83.5	82.6

[0063]

哈夫单位	77.9	81.9	82.8
蛋重 (g)	65.4	66.8	66.5
蛋壳光洁度	++	+++	+++
死淘率 (%)	3.8	2.0	1.6
鸡瘟病毒抗体 (ELISA, OD 值)	0.77	0.76	1.32

[0064] 述：蛋壳光洁度用 + 的多少表示，越多代表光洁度越好。

[0065] 从表中可以看出，虽然添加了粪肠球菌饲料添加剂一组的蛋重、产蛋率等指标不如抗生素组好，但却显著降低了鸡舍的氨气、硫化氢等有害气体、降低死淘率、抗体水平也得到了较大的提高，有着良好的经济效益和生态效益，同时也有助于降低药物残留问题，提高了食品的安全性。

[0001]

序 列 表

<110> 北京大北农业科技集团股份有限公司、内蒙古四季春饲料有限公司、北京科高大北农饲料有限责任公司

<120> 粪肠球菌及其应用与其饲料添加剂和发酵剂

<130> 大北农 1

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1428

<212> DNA

<213> 粪肠球菌 (Enterococcus faecalis)

<400> 1

tctcgcagtc gacgcttctt tectcecgag tgcctgcact caattggaaa gaggagtggc	60
ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctac ccatcagagg gggataacac ttggaaacag	120
gtgctaatac cgcataacag ttatgcccgc atggcataag agtgaaggc gctttcgggt	180
gtcgtgatg gatggaccgg cgggtgcatta gctagtggg gaggtaacgg ctcaccaagg	240
ccacgatgca tagccgacct gagaggggta tggccacac tgggactgag acacggccca	300
gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttcggcaatg gacgaaagtc tgaccgagca	360
acgccgcgtg agtgaagaag gtttccgat cgtaaaactc tgttgttaga gaagaacaag	420
gacgttagta actgaacgtc ccctgacggt atctaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttgccc ggatttattg ggcgtaaagc	540
gagcgcaggc ggtttcttaa gctgatgtg aaagccccg gctcaaccgg ggagggtcat	600
tggaaactgg gagacttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccatgtgt agcggtgaaa	660
tgcgtagata tatggaggaa caccagtggc gaaggcggct ctctggtctg taactgacgc	720
tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaa	780
cgatgagtgc taagtgttg agggtttccg cccttcagtg ctgcagcaa cgattaagc	840
actccgctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaa ggaattgacg ggggcccgca	900
caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
atcctttgac cactctagag atagagcitt cccttcgggg acaaagtac aggtggtgca	1020
tggttgcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct	1080

[0002]

tattgtagt tgccatcatt tagttgggca ctctagcgag actgccggtg acaaaccgga	1140
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
caatgggaag tacaacgagt cgctagaccg cgaggatcatg caaatctctt aaagcttctc	1260
tcagttcggg ttgcaggctg caactcgcct gcatgaagcc ggaatcgcta gtaatcgcg	1320
atcagcacgc cgcgggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga	1380
gagttttaa cacccgaagt cggtaggta accttttgag ccagccgc	1428

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

agagtttgat cctggctcag	20
-----------------------	----

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ggttaccttg ttacgactt	19
----------------------	----

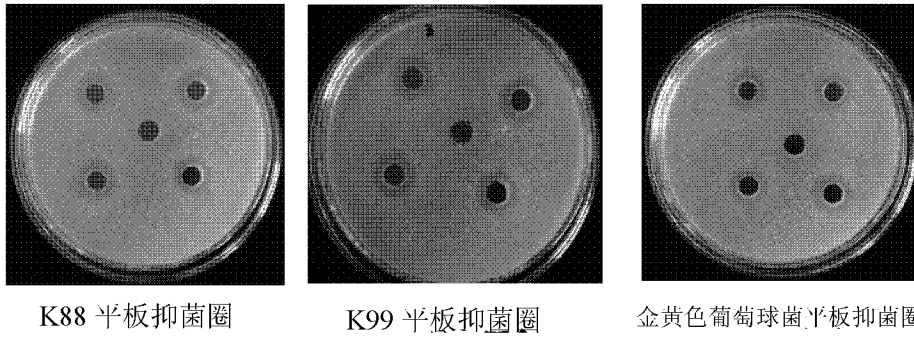


图 1

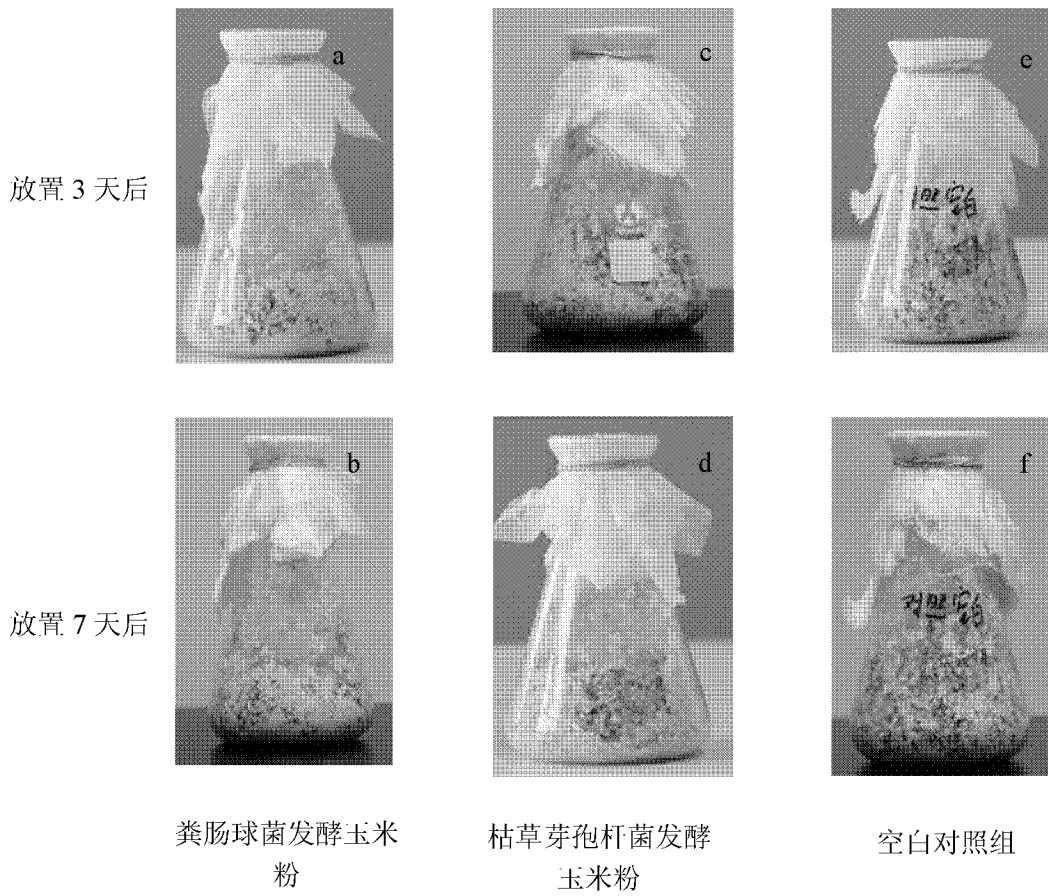


图 2