



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111172077 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 202010093360.6	A23K 10/30(2016.01)
(22)申请日 2020.02.14	A23K 10/37(2016.01)
(71)申请人 广东中科无抗养殖科技有限公司	A23K 10/33(2016.01)
地址 510700 广东省广州市黄埔区蓝玉四	C12R 1/23(2006.01)
街9号3号厂房101房	C12R 1/225(2006.01)
(72)发明人 莫艳华 姚康 马国华 黄海红	C12R 1/01(2006.01)
(74)专利代理机构 广东广信君达律师事务所	C12R 1/865(2006.01)
44329	C12R 1/72(2006.01)
代理人 江间开	C12R 1/125(2006.01)
(51) Int. Cl.	C12R 1/10(2006.01)
C12N 1/20(2006.01)	
C12N 1/18(2006.01)	
C12N 1/16(2006.01)	
A23K 50/30(2016.01)	
A23K 10/12(2016.01)	

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂及制备方法

(57)摘要

本发明属于微生物饲料添加剂领域,具体涉及一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂及制备方法。本发明将嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌依次经过活化培养、液体菌种培养、复合微生物制剂菌种培养和成品培养,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂。该微生物制剂进一步与其他组分发酵制得猪发酵料,该猪发酵料可添加于饲料中,可改变猪肠道微生物群组成,调节生猪肠道微生态平衡,保证生猪健康生长。

1. 一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法,其特征在于包含如下步骤:

(1) 菌种活化培养:将冷冻保藏的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 分别进行多次活化,得到嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种;

(2) 液体菌种培养

①将步骤(1)制得的嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于液体培养基中,37℃兼性厌氧培养2~3天,得到乳酸菌种子液;

②将步骤(1)制得的动物双歧杆菌活化菌种接种于液体培养基中,37℃厌氧培养2~3天,得到动物双歧杆菌种子液;

③将步骤(1)制得的酿酒酵母和产朊假丝酵母活化菌种等质量比混合接种于液体培养基中,摇床转速150~200r/min、温度28~30℃培养2天,得到酵母菌种子液;

④将步骤(1)制得的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种等质量比混合接种于液体培养基中,摇床转速150~200r/min、温度30~35℃培养1~2天,得到芽孢杆菌种子液;

(3) 复合微生物制剂菌种培养:将步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速150~200r/min、温度30℃培养1~2天,然后将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,37℃厌氧培养3~5天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%;

(4) 成品培养:将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种按重量百分比5~8%接种至发酵培养基中,28~30℃密闭发酵7~15天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;其中,该步骤发酵培养基不用灭菌。

2. 根据权利要求1所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的菌株分别为嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CICC 6086、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) ACCC 03958、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*) CICC 6174、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) CICC 1355、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) CICC 31170、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CICC 24434、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC 1.10257。

3. 根据权利要求1所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法,其特征在于:

步骤(3)中所述的发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:

工业用废糖蜜5%、酵母粉0.5%、蛋白胨1%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%、余量为弱碱性小分子还原水补至100%。

4. 根据权利要求1所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法,其特征在于:

步骤(4)中所述的发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:

工业用废糖蜜5~8%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%，弱碱性小分子还原水补足100%。

5. 一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂，其特征在于通过权利要求1~4任一项所述的制备方法制备得到。

6. 权利要求5所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂在制备猪饲料添加剂中的应用。

7. 一种猪发酵料，其特征在于由如下按质量份计的原料发酵制得：

玉米	60 份；
豆粕	25 份；
麦麸	5 份；
构树叶	5 份；
茶叶	5 份；
权利要求 7 所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂	3 份；
工业用废糖蜜	1 份。

8. 根据权利要求7所述的猪发酵料的制备方法，其特征在于包含如下步骤：

将玉米、豆粕、麦麸、构树叶和茶叶分别粉碎过筛并混合均匀，得到混合原料；将调节生猪肠道菌群的微生物制剂和工业用废糖蜜加50质量份的水混匀后喷洒到混合原料上；密封发酵，其中，夏天发酵10~15天，冬天发酵15~20天，得到猪发酵料。

9. 权利要求7所述的猪发酵料在制备猪饲料中的应用。

10. 根据权利要求9所述的猪发酵料在制备猪饲料中的应用，其特征在于：
所述的猪饲料中包含5~15wt%猪发酵料。

一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物饲料添加剂领域,具体涉及一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂及制备方法。

背景技术

[0002] 动物的肠道微生物生态系统是一最大、最复杂的微生态系统,各种细菌相互制约,相互依存。肠道微生物一方面可以帮助宿主消化食物,提供宿主各种营养物质;另一方面能够调节并维持宿主肠道内的微生态平衡,与宿主的生长、发育、物质代谢、衰老等关系密切,对宿主健康起着及其重要的作用。微生物制剂是近年来发展起来的新型绿色饲料添加剂,其无毒、无残留,能够调节动物肠道菌群,抑制有害菌,促进生长发育,改善畜牧养殖生态环境,达到生态防治的目的,具有良好的经济效益和生态效益。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术的不足和缺点,本发明的首要目的在于提供一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法。

[0004] 本发明的另一目的在于提供上述制备方法制备得到的调节生猪肠道菌群的微生物制剂。

[0005] 本发明的再一目的在于提供上述调节生猪肠道菌群的微生物制剂的应用。

[0006] 本发明的第四个目的在于提供一种猪发酵料,该猪发酵料由上述调节生猪肠道菌群的微生物制剂和其他组分一起发酵制得。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂的制备方法,包含如下步骤:

[0009] (1) 菌种活化培养:将冷冻保藏的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 分别进行多次活化,得到嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种;

[0010] (2) 液体菌种培养

[0011] ①将步骤(1)制得的嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于液体培养基中,37℃兼性厌氧培养2~3天,得到乳酸菌种子液;

[0012] ②将步骤(1)制得的动物双歧杆菌活化菌种接种于液体培养基中,37℃厌氧培养2~3天,得到动物双歧杆菌种子液;

[0013] ③将步骤(1)制得的酿酒酵母和产朊假丝酵母活化菌种等质量比混合接种于液体培养基中,摇床转速150~200r/min、温度28~30℃培养2天,得到酵母菌种子液;

[0014] ④将步骤(1)制得的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种等质量比混合接种于

液体培养基中,摇床转速150~200r/min、温度30~35℃培养1~2天,得到芽孢杆菌种子液;

[0015] (3) 复合微生物制剂菌种培养:将步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速150~200r/min、温度30℃培养1~2天,然后将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,37℃厌氧培养3~5天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%;

[0016] (4) 成品培养:将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种按重量百分比5~8%接种至发酵培养基中,28~30℃密闭发酵7~15天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;其中,该步骤发酵培养基不用灭菌;

[0017] 步骤(1)中所述的嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的菌株分别为嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)CICC 6086、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)ACCC 03958、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)CICC 6174、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CICC 1355、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)CICC 31170、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CICC 24434、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)CGMCC 1.10257;

[0018] 步骤(1)中所述的多次活化的具体操作优选为:

[0019] 将冷冻保藏的嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)分别进行三次斜面活化,然后再进行平板纯化培养,最后进行斜面培养,得到嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种;

[0020] 步骤(1)中所述的斜面活化、平板纯化培养或斜面培养的条件优选为:

[0021] 嗜酸乳杆菌或保加利亚乳杆菌37℃兼性厌氧培养2~3天;

[0022] 动物双歧杆菌37℃厌氧培养3~5天;

[0023] 酿酒酵母或产朊假丝酵母28~30℃好氧培养2天;

[0024] 枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌30℃好氧培养2~3天;

[0025] 步骤(1)中所述的斜面活化、平板纯化培养或斜面培养的培养基优选为:

[0026] 用于培养嗜酸乳杆菌或保加利亚乳杆菌的培养基,每一升包含如下组分:酵母膏7.5克、蛋白胨7.5克、葡萄糖10克、磷酸二氢钾2克、吐温80 0.5ml、西红柿汁20ml、土豆汁30ml、胡萝卜汁60ml、维生素C 2克、琼脂15克、弱碱性小分子还原水补至1000ml、pH6.8、121℃灭菌20min;

[0027] 用于培养动物双歧杆菌的培养基,每一升包含如下组分:蛋白胨15.0克、酵母粉2.0克、葡萄糖20.0克、可溶性淀粉0.5克、氯化钠5.0克、5%半胱氨酸10.0ml、西红柿浸出液400.0ml、吐温80 1.0ml、肝提取液80.0ml、琼脂20.0克、弱碱性小分子还原水补至1000ml、pH7.0,115℃高压灭菌15~20min;

[0028] 用于培养酿酒酵母或产朊假丝酵母的培养基,每一升包含如下组分:蛋白胨20克、酵母粉10克、葡萄糖20克、琼脂20.0克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH6.0、121℃灭菌

20min;

[0029] 用于培养枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的培养基,每一升包含如下组分:酵母膏5克、牛肉膏5克、蛋白胨10克、氯化钠10克、硫酸锰7.5克、硫酸镁0.5克、磷酸二氢钾2克、琼脂15克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH7.2、121℃灭菌20min;

[0030] 步骤(2)①所述的液体培养基(乳酸菌)每一升包含如下组分:

[0031] 蛋白胨10克、牛肉膏10克、酵母粉5克、葡萄糖5克、乙酸钠5克、柠檬酸二胺2克、吐温80 0.5ml、磷酸氢二钾2克、硫酸镁0.2克、硫酸锰0.05克、碳酸钙20克、西红柿汁20ml、土豆汁30ml、胡萝卜汁60ml、维生素C 2克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH6.8、112℃灭菌20min;

[0032] 步骤(2)②所述的液体培养基(动物双歧杆菌)每一升包含如下组分:

[0033] 蛋白胨15.0克、酵母粉2.0克、葡萄糖20.0克、可溶性淀粉0.5克、氯化钠5克、5%半胱氨酸10.0ml、西红柿浸出液400.0ml、吐温80 1.0ml、肝提取液80.0ml、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH7.0、115℃高压灭菌15~20min;

[0034] 步骤(2)③所述的液体培养基(酵母菌)每一升包含如下组分:

[0035] 红糖50克、酵母膏20克、硫酸铵1克、氯化钾2克,pH自然,弱碱性小分子还原水补至1000ml,121℃灭菌20min;

[0036] 步骤(2)④所述的液体培养基(芽孢杆菌)每一升包含如下组分:

[0037] 葡萄糖30克、酵母膏15克、磷酸氢二钠2克、磷酸二氢钠1克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH7.2、112℃灭菌20min;

[0038] 步骤(3)中所述的发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:

[0039] 工业用废糖蜜5%、酵母粉0.5%、蛋白胨1%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%、余量为弱碱性小分子还原水补至100%;

[0040] 步骤(4)中所述的发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:

[0041] 工业用废糖蜜5~8%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%,弱碱性小分子还原水补至100%;

[0042] 步骤(4)中所述的密闭发酵的具体操作优选为:

[0043] ①将培养容器、配制培养基相关的容器清洗干净并用酸性氧化电位水(简称酸化消毒水)消毒;

[0044] ②按照配比称取发酵培养基的组分(香蕉多糖、氯化铵、氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锌、硫酸亚铁等)加入容器1中,然后加入弱碱性小分子还原水,使其充分溶解;

[0045] ③按照配比称取工业用废糖蜜加入容器2中,然后加入弱碱性小分子还原水,使其充分溶解;

[0046] ④将步骤②制得的溶液和步骤③制得的溶液加入到培养容器中,然后加弱碱性小分子还原水至培养基总体积的80%;

[0047] ⑤将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种摇匀后,按重量百分比5~8%的接种量(相对于培养基总量)接种至培养容器中;

[0048] ⑥接种后,在培养容器中加入弱碱性小分子还原水至培养基总体积的100%,搅拌均匀,28~30℃密闭发酵7~15天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;

- [0049] 一种调节生猪肠道菌群的微生物制剂,通过上述制备方法制备得到;
- [0050] 所述的调节生猪肠道菌群的微生物制剂在制备猪饲料添加剂中的应用;
- [0051] 一种猪发酵料,由如下按质量份计的原料发酵制得:
- | | |
|----------------|-------|
| 玉米 | 60 份; |
| 豆粕 | 25 份; |
| 麦麸 | 5 份; |
| [0052] 构树叶 | 5 份; |
| 茶叶 | 5 份; |
| 调节生猪肠道菌群的微生物制剂 | 3 份; |
| 工业用废糖蜜 | 1 份; |
- [0053] 所述的构树叶和茶叶优选为干燥后的构树叶和茶叶;
- [0054] 所述的猪发酵料的制备方法,包含如下步骤:
- [0055] 将玉米、豆粕、麦麸、构树叶和茶叶分别粉碎过筛并混合均匀,得到混合原料;将调节生猪肠道菌群的微生物制剂和工业用废糖蜜加50质量份的水混匀后喷洒到混合原料上;密封发酵,其中,夏天发酵10~15天,冬天发酵15~20天,得到猪发酵料;
- [0056] 所述的过筛的目数优选为40目;
- [0057] 所述的猪发酵料在制备猪饲料中的应用;
- [0058] 所述的猪饲料中优选包含5~15wt%猪发酵料;
- [0059] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0060] (1) 本发明采用混合培养技术,各种微生物之间相互提供特定的生长营养物;提高微生物的生物量和生理代谢功能;弥补单独培养代谢上的不足,利用共生、偏利共生等促进复合微生物的生长,与传统的纯培养技术相比具有许多明显优点。
- [0061] (2) 成品发酵过程中发酵培养基不需要经过消毒直接用于复合微生物制剂的培养,在培养过程中也不需要搅拌,可节省人力物力,从而提高经济效益。
- [0062] (3) 本发明提供的调节生猪肠道菌群的微生物制剂的有效成分主要包括活菌、死菌以及代谢物,其主要作用是改变肠道微生物群组成,使有益或无害微生物占据种群优势,通过竞争抑制病原菌或有害微生物的增殖,调节生猪肠道微生态平衡。其中,有益微生物进入生猪肠道后,可以和肠道内有益菌一起,迅速形成优势微生物菌群,抑制肠道有害菌的生长,其中的有益微生物在肠道壁周围,通过磷壁酸与肠粘膜上皮细胞紧密结合,形成菌膜屏障,阻止有害菌的定植,调节生猪肠道微生态平衡。
- [0063] (4) 本发明利用制得的调节生猪肠道菌群的微生物制剂对饲料原料进行发酵,发酵初期,以酵母菌的生长代谢为主,酵母菌能快速消耗 O_2 ,并且能耐受很强的酸性环境(pH3.2左右)。当酵母菌消耗完 O_2 以后,为芽孢杆菌、乳酸菌、动物双歧杆菌的生长繁殖创造了有利条件。随着乳酸菌的生长代谢,乳酸菌的数量不断增加,一些大分子营养物质(如蛋白质、多糖、脂肪等)不断地转化为小分子营养物质,有机酸、多肽、游离氨基酸和维生素等不断增加,饲料的营养价值得到了很大的提升。发酵期间乳酸菌、双歧杆菌能产生乳酸、乙酸等有机酸,降低pH值,抑制大肠杆菌、沙门氏杆菌等的增殖,芽孢杆菌产生抗菌肽,乳酸菌

产生细菌素,它们能有效杀死饲料原料中的有害菌(如大肠杆菌和沙门氏菌)。发酵接近成熟期,乳酸菌占绝对主导,动物双歧杆菌菌种、酵母菌和芽孢杆菌数量趋于平稳,形成一个复杂而稳定的具备多种功能的微生态系统。发酵饲料的生产只需接种、混合、发酵三个过程即可完成。原料不经过消毒可直接用于发酵生产,在生产过程中也不需要人工翻动,发酵成品无需烘干,可节省大量劳动力并降低工人劳动强度。

具体实施方式

[0064] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0065] 实施例中涉及的嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的菌株分别为嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)CICC 6086、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)ACCC 03958、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)CICC 6174、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CICC 1355、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)CICC 31170;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CICC 24434、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)CGMCC 1.10257;

[0066] 实施例中的酸性氧化电位水(简称酸化消毒水)是在水中加入0.1wt%以下的食盐(氯化钠)输入电解槽中电解,在电解槽的阳极处生成的pH2~3、氧化还原电位1100mV以上,活性氯50~70mg的水溶液,是一种高效、速效、广谱、无毒、无刺激、无残留、安全、环保的消毒剂。

[0067] 实施例中菌种活化培养(斜面活化、平板纯化培养或斜面培养)过程中,各菌株的培养基为:

[0068] 用于培养嗜酸乳杆菌或保加利亚乳杆菌的培养基,每一升包含如下组分:酵母膏7.5克、蛋白胨7.5克、葡萄糖10克、磷酸二氢钾2克、吐温80 0.5ml、西红柿汁20ml、土豆汁30ml、胡萝卜汁60ml、维生素C 2克、琼脂15克、弱碱性小分子还原水补至1000ml、pH6.8、121℃灭菌20min;

[0069] 用于培养动物双歧杆菌的培养基,每一升包含如下组分:蛋白胨15.0克、酵母粉2.0克、葡萄糖20.0克、可溶性淀粉0.5克、氯化钠5.0克、5%半胱氨酸10.0ml、西红柿浸出液400.0ml、吐温80 1.0ml、肝提取液80.0ml、琼脂20.0克、弱碱性小分子还原水补至1000ml、pH7.0,115℃高压灭菌15~20min;

[0070] 用于培养酿酒酵母或产朊假丝酵母的培养基,每一升包含如下组分:蛋白胨20克、酵母粉10克、葡萄糖20克、琼脂20.0克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH6.0、121℃灭菌20min;

[0071] 用于培养枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的培养基,每一升包含如下组分:酵母膏5克、牛肉膏5克、蛋白胨10克、氯化钠10克、硫酸锰7.5克、硫酸镁0.5克、磷酸二氢钾2克、琼脂15克、弱碱性小分子还原水补至1000ml,pH7.2、121℃灭菌20min;

[0072] 实施例中液体菌种培养过程中,各菌株的培养基为:

[0073] 步骤(2)①所述的液体培养基(乳酸菌)每一升包含如下组分:

[0074] 蛋白胨10克、牛肉膏10克、酵母粉5克、葡萄糖5克、乙酸钠5克、柠檬酸二胺2克、吐温80 0.5ml、磷酸氢二钾2克、硫酸镁0.2克、硫酸锰0.05克、碳酸钙20克、西红柿汁20ml、土

豆汁30ml、胡萝卜汁60ml、维生素C 2克、弱碱性小分子还原水补至1000ml, pH6.8、112℃灭菌20min;

[0075] 步骤(2)②所述的液体培养基(动物双歧杆菌)每一升包含如下组分:

[0076] 蛋白胨15.0克、酵母粉2.0克、葡萄糖20.0克、可溶性淀粉0.5克、氯化钠5克、5%半胱氨酸10.0ml、西红柿浸出液400.0ml、吐温80 1.0ml、肝提取液80.0ml、弱碱性小分子还原水补至1000ml, pH7.0、115℃高压灭菌15~20min;

[0077] 步骤(2)③所述的液体培养基(酵母菌)每一升包含如下组分:

[0078] 红糖50克、酵母膏20克、硫酸铵1克、氯化钾2克、pH自然,弱碱性小分子还原水补至1000ml, 121℃灭菌20min;

[0079] 步骤(2)④所述的液体培养基(芽孢杆菌)每一升包含如下组分:

[0080] 葡萄糖30克、酵母膏15克、磷酸氢二钠2克、磷酸二氢钠1克、弱碱性小分子还原水补至1000ml, pH7.2、112℃灭菌20min;

[0081] 实施例中复合微生物制剂菌种培养过程中,发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:

[0082] 工业用废糖蜜5%、酵母粉0.5%、蛋白胨1%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%、余量为弱碱性小分子还原水补至100%;

[0083] 实施例1

[0084] (1)菌种活化培养:将冷冻保藏管中的嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌分别在18x180mm试管斜面中活化,活化三次,之后分别置于90mm培养皿中进行纯化培养,然后再分别在18x180mm试管斜面中培养,得到嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、动物双歧杆菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌活化菌种;其中,培养条件具体为:嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌37℃兼性厌氧培养2天,动物双歧杆菌37℃厌氧培养5天,酿酒酵母、产朊假丝酵母28℃好氧培养2天,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌30℃好氧培养2天。

[0085] (2)液体菌种培养

[0086] ①将嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃兼性厌氧培养2天,得到乳酸菌种子液;

[0087] ②将动物双歧杆菌活化菌种接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃厌氧培养2天,得到动物双歧杆菌种子液;

[0088] ③将酿酒酵母和产朊假丝酵母活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速150r/min、温度30℃,装液量25mL/250mL,培养2天,得到酵母菌种子液;

[0089] ④将枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速200r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL,培养1天,得到芽孢杆菌种子液;

[0090] (3)复合菌种培养:将步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速200r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL培养1天,然后将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,37℃厌氧培养5天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子

液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%;

[0091] (4) 成品培养

[0092] ①将培养容器、配制培养基相关的容器清洗干净并用酸性氧化电位水(简称酸化消毒水)消毒;

[0093] ②按照配比称取发酵培养基的组分香蕉多糖、氯化铵、氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锌、硫酸亚铁等加入容器1中,然后加入弱碱性小分子还原水,使其充分溶解;

[0094] ③按照配比称取工业用废糖蜜加入容器2中,然后加入弱碱性小分子还原水,使其充分溶解;

[0095] ④将步骤②制得的溶液和步骤③制得的溶液加入到培养容器中,溶解培养基和糖蜜的容器用少量的弱碱性小分子还原水洗涤几次以保证各种成分都加进培养容器中,然后加弱碱性小分子还原水至培养基总体积的80%;

[0096] ⑤将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种摇匀后,按重量百分比5%的接种量(相对于培养基总量)接种至培养容器中,量取菌种容器用少量的弱碱性小分子还原水洗涤几次以保证菌种全部加入培养容器中;

[0097] ⑥接种后,在培养容器中加入弱碱性小分子还原水至培养基总体积的100%,搅拌均匀后盖上盖子,28℃密闭发酵15天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;其中,发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:工业用废糖蜜5%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%,弱碱性小分子还原水补足100%。

[0098] 实施例2

[0099] (1) 菌种活化培养:具体方法同实施例1,其中,培养条件具体为:嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌37℃兼性厌氧培养3天,动物双歧杆菌37℃厌氧培养4天,酿酒酵母、产朊假丝酵母30℃好氧培养2天,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌30℃好氧培养2天;

[0100] (2) 液体菌种培养

[0101] ①将嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃兼性厌氧培养2.5天,得到乳酸菌种子液;

[0102] ②将动物双歧杆菌活化菌种接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃厌氧培养3天,得到动物双歧杆菌种子液;

[0103] ③将酿酒酵母和产朊假丝酵母活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速180r/min、温度29℃,装液量25mL/250mL,培养2天,得到酵母菌种子液;

[0104] ④将枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速180r/min、温度32℃,装液量30mL/250mL,培养1.5天,得到芽孢杆菌种子液;

[0105] (3) 复合菌种培养:将步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速180r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL培养2天,然后将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,37℃厌氧培养3天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%;

[0106] (4) 成品培养

[0107] 步骤①~④同实施例1；

[0108] ⑤将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种摇匀后,按重量百分比6%的接种量(相对于培养基总量)接种至培养容器中,量取菌种容器用少量的弱碱性小分子还原水洗涤几次以保证菌种全部加入培养容器中；

[0109] ⑥接种后,在培养容器中加入弱碱性小分子还原水至培养基总体积的100%,搅拌均匀后盖上盖子,29℃密闭发酵10天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;其中,发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:工业用废糖蜜6%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%,弱碱性小分子还原水补足100%。

[0110] 实施例3

[0111] (1) 菌种活化培养:具体方法同实施例1,其中,培养条件具体为:嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌37℃兼性厌氧培养3天,动物双歧杆菌37℃厌氧培养3天,酿酒酵母、产朊假丝酵母29℃好氧培养2天,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌30℃好氧培养3天。

[0112] (2) 液体菌种培养

[0113] ①将嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃兼性厌氧培养3天,得到乳酸菌种子液；

[0114] ②将动物双歧杆菌活化菌种接种于已灭菌的液体培养基中,装液量90mL/100mL;37℃厌氧培养2.5天,得到动物双歧杆菌种子液；

[0115] ③将酿酒酵母和产朊假丝酵母活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速200r/min、温度28℃,装液量25mL/250mL,培养2天,得到酵母菌种子液；

[0116] ④将枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,摇床转速150r/min、温度35℃,装液量30mL/250mL,培养1天,得到芽孢杆菌种子液；

[0117] (3) 复合菌种培养:将步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速150r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL培养1天,然后将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,37℃厌氧培养4天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%；

[0118] (4) 成品培养

[0119] 步骤①~④同实施例1；

[0120] ⑤将步骤(3)制得的复合微生物制剂菌种摇匀后,按重量百分比8%的接种量(相对于培养基总量)接种至培养容器中,量取菌种容器用少量的弱碱性小分子还原水洗涤几次以保证菌种全部加入培养容器中；

[0121] ⑥接种后,在培养容器中加入弱碱性小分子还原水至培养基总体积的100%,搅拌均匀后盖上盖子,30℃密闭发酵7天,得到调节生猪肠道菌群的微生物制剂;其中,发酵培养基包含如下按质量百分比计的组分:工业用废糖蜜8%、香蕉多糖0.3%、氯化铵0.2%、氯化钠0.05%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、硫酸锌0.025%、硫酸亚铁0.025%,弱碱性小分子还原水补足100%。

[0122] 对比实施例1

[0123] (1) 菌种活化培养:具体方法同实施例2;

[0124] (2) 液体菌种培养:具体方法同实施例2;

[0125] (3) 复合菌种培养:将步骤(2)制得的乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液同时接种于已灭菌的发酵培养基中,摇床转速180r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL培养2天,然后37℃厌氧培养3天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%。

[0126] 对比实施例2

[0127] (1) 菌种活化培养:具体方法同实施例2;

[0128] (2) 液体菌种培养:具体方法同实施例2;

[0129] (3) 复合菌种培养:将步骤(2)制得的乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液接种于已灭菌的发酵培养基中,37℃厌氧培养3天;然后步骤(2)制得的酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液同时接种至上述发酵体系中,摇床转速180r/min、温度30℃,装液量30mL/250mL培养2天,得到复合微生物制剂菌种;其中,乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液的质量比为5:2:4:3,总接种量为重量百分比10%。

[0130] 效果实施例1

[0131] 对比实施例1是将乳酸菌种子液、动物双歧杆菌种子液、酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液同时接种于已灭菌的发酵培养基中,先好氧培养2天,再厌氧培养3天;对比实施例2则是先将乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液接种于发酵培养基中,厌氧培养3天,然后再接种酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液,好氧培养2天;实施例2则是先将酵母菌种子液和芽孢杆菌种子液接种于发酵培养基中,好氧培养2天,然后再接种乳酸菌种子液和动物双歧杆菌种子液,厌氧培养3天;其他参数均相同。

[0132] 表1是实施例2以及对比实施例1和2获得的复合微生物制剂菌种中各菌计数结果,从表1中可以看出,按照对比实施例1的接种顺序,芽孢杆菌培养后期大量死亡;按照对比实施例2的接种顺序,芽孢杆菌和酵母菌生长不好;而按照实施例2的接种顺序,细胞均达到了较高的生长量。这表明实施例2的接种顺序是最佳接种顺序。

[0133] 表1不同接种顺序计数结果((cfu/ml))

接种顺序	乳酸菌	动物双歧杆菌	芽孢杆菌	酵母菌
对比实施例1	1.43×10^9	2.23×10^8	1.13×10^5	6.40×10^6
对比实施例2	1.51×10^9	3.67×10^8	1.35×10^5	6.28×10^6
实施例2	1.97×10^{10}	8.41×10^9	6.31×10^8	7.92×10^9

[0135] 应用实施例

[0136] (1) 将玉米60kg、豆粕25kg、麦麸5kg、构树叶(晒干)5kg、茶叶(晒干)5kg分别粉碎过40目筛并混合均匀,得到混合原料;

[0137] (2) 将实施例2制得的调节生猪肠道菌群的微生物制剂3kg、工业用废糖蜜1kg加50kg水混匀后喷洒到混合原料上,边喷洒边搅拌原料,将其混合均匀,湿度以手捏成团不滴水,一触即散为宜;然后装入厚塑料袋,用扎带扎紧,放在常温、防鼠的地方发酵,发酵15天,有酒香味即发酵完成,得到猪发酵料。

[0138] 效果实施例2

[0139] 为了更好地说明本发明应用实施例制得的猪发酵料能够促进有益微生物在生猪肠道的定殖,进一步影响肠道菌群环境、调节肠道微生态平衡。发明人进行了如下试验。其中,本实施例中的乳酸菌菌液($\geq 10^8$ CFU/ml)将嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌活化菌种等质量比混合接种于已灭菌的液体培养基中,37℃兼性厌氧培养3天得到。

[0140] 试验在江西省赣州市安远县八戒王国进行,试验生猪选用体重30kg左右的杜、大、长三元杂交猪300头,随机分成5组。每组3个重复,每个重复20头。分别饲喂5种不同处理的日粮:基础日粮(对照组)、基础日粮+5wt%猪发酵料(处理1)、基础日粮+10wt%猪发酵料(处理2)、基础日粮+5%乳酸菌菌液(处理3)基础日粮+10%乳酸菌菌液(处理4)。基础日粮参照生长猪营养需要配制,试验期为70d。饲喂粉料,人工喂料,自由采食。每次以吃饱略剩料为宜,每日饲喂3次,乳头式饮水器自由饮水。免疫程序按常规进行。

[0141] 试验结束时每重复随机选取2头猪,从直肠中取肠道内容物0.5g于7mL的灭菌离心管中,加入无菌生理盐水4.5mL,用漩涡混合仪将稀释液充分混匀,吸取上清液100uL于盛有900uL无菌生理盐水的18x180mm试管中依次进行10倍稀释。细菌数量用平板菌落计数法在37℃下培养48h后进行菌落计数,以每克肠道内容物中细菌个数CFU/g表示。大肠杆菌培养使用麦康凯琼脂培养基,沙门氏菌培养使用SS琼脂培养基,乳酸菌培养使用MRS培养基。

[0142] 试验结果见表2,与对照组相比,处理1、处理2、处理3、处理4生猪肠道大肠杆菌数量分别降低了35.96%、41.77%、11.62%、15.35%,沙门氏菌数量与对照组相比分别下降了44.30%、51.26%、14.37%、17.19%,各试验组肠道乳酸菌数量均高于对照组,且与对照组相比分别提高了240.74%、284.20%、182.79%、184.86%,但处理1、处理2明显优于处理3、处理4。

[0143] 表2复合微生物制剂对生猪肠道菌群的影响(CFU/g)

菌类	对照组	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4
大肠杆菌	7.23	4.63	4.21	6.39	6.12
沙门氏菌	6.75	3.76	3.29	5.78	5.59
乳酸菌	9.18	31.28	35.27	25.96	26.15

[0146] 由此可见,生猪进入生长期阶段,肠道菌群逐渐发生变化,大肠杆菌等致病菌数量上升,乳酸菌等有益菌数量下降;日粮中添加复合微生物制剂发酵料能够改善生猪生长性能,降低生猪肠道大肠杆菌、沙门氏菌数量,促进肠道乳酸菌增殖,保证生猪健康生长。

[0147] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。