



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102293340 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 201110236587.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.08.17

A23K 1/18(2006.01)

A23K 1/175(2006.01)

(83) 生物保藏信息

A23K 1/16(2006.01)

CGMCC No. 5093 2011.07.26

A23K 1/14(2006.01)

CGMCC No. 5094 2011.07.26

CGMCC No. 2388 2008.03.03

审查员 王迪

(73) 专利权人 北京大北农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 哈尔滨大北农牧业科技有限公司
北京科高大北农饲料有限责任公司

(72) 发明人 阎桂玲 王松 杜建涛 赵莉莉
贡桂玲 王安如

权利要求书1页 说明书11页

(54) 发明名称

一种可提高免疫功能的猪用复合预混料

(57) 摘要

本发明提供一种可提高免疫功能的猪用复合预混料,属于预混料领域。本发明的预混料主要由下述成分制备而成:硫酸亚铁、硫酸铜、硫酸锌、硫酸锰、碘化钾、氯化钴、亚硒酸钠、有机微量元素、多种维生素、泛酸、烟酸、叶酸、生物素、赖氨酸、复合微生态制剂、乙氧基喹啉、50%氯化胆碱、沸石粉、麸皮。本发明的预混料配方合理,未添加抗生素,包含多种益生菌,活菌含量高,动物饲养实验证实饲喂效果理想,能使猪成活率高、增重快、饲料转化效率提高。本发明的预混料有助于改善猪肠道微生态环境,维护肠道健康,提高猪免疫机能,减少疾病发生,促进猪生长,能满足目前广大养殖户的需求,且适合用于发展绿色健康养殖,生产无公害畜牧产品。

1. 一种可提高免疫功能的猪用复合预混料,其特征在于它主要成分为下述重量配比的原料,每千克预混料中有:硫酸亚铁 30 ~ 40g、硫酸铜 10 ~ 15g、硫酸锌 12 ~ 22g、硫酸锰 2 ~ 6g、1%碘化钾 0.08 ~ 0.23g、氯化钴 0.3 ~ 0.6g、1%亚硒酸钠 0.1 ~ 0.18g、有机铁 15 ~ 25g、有机铜 5 ~ 10g、有机锌 6 ~ 25g、有机锰 2 ~ 10g、维生素 A0.30 ~ 0.40g、维生素 D34 ~ 5g、维生素 E3.2 ~ 4g、维生素 K30.18 ~ 0.25g、维生素 B10.30 ~ 0.50g、维生素 B20.30 ~ 0.70g、维生素 B60.15 ~ 0.25g、维生素 B120.002 ~ 0.003g、泛酸 1 ~ 3g、烟酸 0.10 ~ 0.40g、叶酸 0.05 ~ 0.10g、生物素 0.010 ~ 0.018g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 100 ~ 200g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 60 ~ 100g、沸石粉 200g,余量为麸皮;所述的复合微生态制剂主要由嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No. 5094 菌粉、酿酒酵母 CGMCC (*Saccharomyces cerevisiae*)No. 2388 菌粉及玉米芯粉组成。

2. 如权利要求 1 所述的猪用复合预混料,其特征在于它主要成分为下述重量配比的原料,每千克预混料中有:硫酸亚铁 35g、硫酸铜 12g、硫酸锌 20g、硫酸锰 4g、1%碘化钾 0.15g、氯化钴 0.5g、1%亚硒酸钠 0.15g、有机铁 20g、有机铜 8g、有机锌 15g、有机锰 6g、维生素 A0.35g、维生素 D34.5g、维生素 E3.5g、维生素 K30.20g、维生素 B10.40g、维生素 B20.65g、维生素 B60.20g、维生素 B120.0022g、泛酸 2.0g、烟酸 0.25g、叶酸 0.08g、生物素 0.015g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 150g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 90g、沸石粉 200g、余量为麸皮。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的猪用复合预混料,其特征在于所述的硫酸亚铁为一水硫酸亚铁,所述的硫酸铜为五水硫酸铜,所述的硫酸锌为一水硫酸锌,所述的硫酸锰为一水硫酸锰,所述的有机铁为蛋氨酸铁,所述的有机铜为赖氨酸铜,所述的有机锌为蛋氨酸锌,所述的有机锰为蛋氨酸锰。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的猪用复合预混料,其特征在于所述的复合微生态制剂中嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No. 5094 菌粉、酿酒酵母 CGMCC (*Saccharomyces cerevisiae*) No. 2388 菌粉及玉米芯粉的重量配比为:1 : 1 : 2 : 20。

一种可提高免疫功能的猪用复合预混料

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可提高免疫功能的猪用复合预混料,属于预混料领域。

背景技术

[0002] 目前,国内预混料种类繁多,但大多添加抗生素类药物。而抗生素长期、大量在动物上应用所带来的负面问题也逐渐被人们所重视。微生态制剂是公认的一类绿色、安全的饲料添加剂,此类制剂是由动物有益菌经工业化发酵生产得到的,包含有很多有益微生物及其代谢产物构成的活菌制剂。但目前,市场上用于预混料的微生态制剂存在以下几个方面的主要质量问题:(1)活菌含量低;(2)水分含量偏高,这是影响微生态制剂质量的重要因素之一;(3)不耐抗生素;(4)抗逆性差(如,热、酸、胆盐等);(5)益生作用不明显(产酸、产酶、病原菌抑制作用等)。由于微生物制剂存在的这些质量问题,限制了其在动物上的应用效果。因此,更需要分离和选育特性优良的饲用微生物菌种,最终研制成含有微生物活菌制剂的无抗、无公害、无残留的绿色猪用复合预混料。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种有效维护猪肠道健康、提高饲料转化效率、稳定性好、安全的可提高免疫功能的猪用复合预混料。该预混料配方合理、通过微生物饲料添加剂的添加平衡肠道菌群,抑制有害细菌的生长繁殖,降低动物肠道的发病率,又能促进动物生长,且适合用于发展绿色健康养殖,生产无公害畜禽产品。

[0004] 本发明的目的是通过如下技术方案实现的:

[0005] 本发明提供一种可提高免疫功能的猪用复合预混料,它主要成分为下述重量配比的原料,每千克预混料中有:硫酸亚铁 30~40g、硫酸铜 10~15g、硫酸锌 12~22g、硫酸锰 2~6g、1%碘化钾 0.08~0.23g、氯化钴 0.3~0.6g、1%亚硒酸钠 0.1~0.18g、有机铁 15~25g、有机铜 5~10g、有机锌 6~25g、有机锰 2~10g、维生素 A 0.30~0.40g、维生素 D₃ 4~5g、维生素 E 3.2~4g、维生素 K 0.18~0.25g、维生素 B₁ 0.30~0.50g、维生素 B₂ 0.30~0.70g、维生素 B₆ 0.15~0.25g、维生素 B₁₂ 0.002~0.003g、泛酸 1~3g、烟酸 0.10~0.40g、叶酸 0.05~0.10g、生物素 0.010~0.018g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 100~200g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 60~100g、沸石粉 200g,余量为麸皮;所述的复合微生态制剂主要由嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC No. 5094 菌粉、酿酒酵母 CGMCC (*Saccharomyces cerevisiae*) No. 2388 菌粉及玉米芯粉组成。

[0006] 进一步,它主要成分为下述重量配比的原料,每千克预混料中有:硫酸亚铁 35g、硫酸铜 12g、硫酸锌 20g、硫酸锰 4g、1%碘化钾 0.15g、氯化钴 0.5g、1%亚硒酸钠 0.15g、有机铁 20g、有机铜 8g、有机锌 15g、有机锰 6g、维生素 A 0.35g、维生素 D₃ 4.5g、维生素 E 3.5g、维生素 K 0.20g、维生素 B₁ 0.40g、维生素 B₂ 0.65g、维生素 B₆ 0.20g、维生素 B₁₂ 0.0022g、泛酸 2.0g、烟酸 0.25g、叶酸 0.08g、生物素 0.015g、赖氨酸 140g、复合微生态制

剂 150g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 90g、沸石粉 200g、余量为麸皮。

[0007] 其中,所述的所述的硫酸亚铁为一水硫酸亚铁,所述的硫酸铜为五水硫酸铜,所述的硫酸锌为一水硫酸锌,所述的硫酸锰为一水硫酸锰,所述的有机铁为蛋氨酸铁、所述的有机铜为赖氨酸铜、所述的有机锌为蛋氨酸锌、所述的有机锰为蛋氨酸锰。本发明中所用的上述物质均可在本领域技术人员的公知范围内进行常规选择。

[0008] 其中,本发明所述的复合生态制剂中嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)CGMCCNo. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No. 5094 菌粉、酿酒酵母 CGMCC(*Saccharomyces cerevisiae*)No. 2388 菌粉及玉米芯粉的重量配比为:1 : 1 : 2 : 20。

[0009] 其中,本发明中所用的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)CGMCC No. 5093、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No. 5094、酿酒酵母 CGMCC(*Saccharomyces cerevisiae*)No. 2388 具有良好的耐胃酸、耐胆盐、耐高温、耐受常用抗生素等抗逆性能和产酸、产酶、抑制病原菌等益生功能,为申请人从健康动物肠道或粪便中分离、选育得到。本发明中的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 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. 5093 ;地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 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、地址同上,保藏编号为 CGMCC No. 5094 ;酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 经中国农业微生物菌种保藏管理中心鉴定,并于 2008 年 3 月 3 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、地址同上,保藏编号为 CGMCC No. 2388 (保藏证明见申请人的申请号为:200810106520.5 的中国发明专利)。

[0010] 本发明的预混料配方合理,动物饲养实验证实饲喂效果理想,能使猪成活率高、增重快、肉料比高;预混料添加的复合生态制剂菌种多样,嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CGMCC No. 5093、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No. 5094、酿酒酵母 CGMCC(*Saccharomyces cerevisiae*)No. 2388 在制备中采用液体深层高密度发酵技术和喷干或者冻干一系列的后处理加工工艺技术制成菌粉,制剂中的活菌含量高、水分含量低,具有耐胃酸、耐胆盐、耐高温及耐受常用抗生素等抗逆性能和产酸、产酶及抑制病原菌等益生功能,可以替代抗生素,可以耐抗生素,可以提高猪机体免疫力、提高饲料转化率、稳定性好,从而保证了动物的肠道健康,降低动物肠道的发病率,又能促进动物生长。本发明的复合预混料对猪只生长和健康状况有良好的促进作用,能满足目前广大养殖户的需求,且适合用于发展绿色健康养殖,生产无公害畜牧产品。

[0011] 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

[0012] 实施例 13 株菌种的抗逆性和生物学性能测定

[0013] 3 株菌种:嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094、酿酒酵母 CGMCC No. 2388 为申请人从健康动物肠道或粪便中分离、选育得到,保藏于 4℃冰箱中。

[0014] 1) 地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 培养物的制备:将冰箱保藏的斜面菌种接种到

BPY 种子培养基中活化, 37℃、200rpm 培养 18h, 得到芽孢率在 95% 以上的培养物;

[0015] 2) 嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 培养物的制备: 将冰箱保藏的斜面菌种接种到 MRS 种子培养基中活化, 35℃、100rpm 培养 16h, 即得;

[0016] 3) 酿酒酵母 CGMCC No. 2388 培养物的制备: 将冰箱保藏的斜面菌种接种到 98 号种子培养基中活化, 30℃、150rpm 培养 16h, 即得;

[0017] 4) 耐酸性测定: 将上述制备的培养物按 5% 接种量分别接种于 pH 值 2.0、3.0、4.0 的人工模拟胃液中, 0h 计数作对照, 2h、6h 取样用磷酸缓冲液按 10 倍系列稀释, 进行平板活菌计数, 计算存活率。

[0018] 本发明选育的 3 株菌种在胃酸中存活率结果见表 1。

[0019] 人工模拟胃液的制备: 量取 9.5%~10.5% 浓盐酸 16.4 毫升, 加蒸馏水至 1000 毫升, 做基础人工胃液, 用盐酸或氢氧化钠调 pH 值 2.0、3.0、4.0, 各取 10mL (9mL), 分装于试管中, 100℃ 下蒸汽灭菌 15 分钟, 在无菌条件下, 每 10mL 液体中加入 0.100g 胃蛋白酶。

[0020] 表 13 株菌种在人工模拟胃液中的存活率

[0021]

胃液 pH 值	存活率 (%)					
	pH2.0		pH 3.0		pH 4.0	
处理时间	2h	6h	2h	6h	2h	6h
地衣芽孢杆菌 CGMCC No.5094	49.8	49.5	56.1	51.5	56.5	78.3
嗜酸乳杆菌 CGMCC No.5093	60.0	20.0	69.9	30.5	75.2	37.6
酿酒酵母 CGMCC No.2388	19.7	15.4	21.0	16.7	49.2	24.4

[0022] 5) 耐胆盐测定: 将上述制备的 3 株菌种的培养物, 按 5% 接种量分别接种于 0.03%、0.1%、0.2%、0.3% 不同浓度的猪胆盐溶液中, 0h 计数作对照, 2h、6h 取样用生理盐水按 10 倍系列稀释计数, 进行平板活菌计数, 计算存活率。

[0023] 本发明所选育的 3 株菌种在胆盐中存活率结果见表 2。

[0024] 胆盐的制备: 0.85% 生理盐水中各 9mL, 分装于试管中, 121℃ 下蒸汽灭菌 30 分钟, 在无菌条件下, 制成 0.03%、0.1%、0.2%、0.3% 不同浓度的猪胆盐溶液。

[0025] 表 23 株菌种在不同浓度猪胆盐中处理 6h 的存活率

[0026]

不同猪胆盐浓度	存活率 (%)			
	0.03%	0.1%	0.2%	0.3%
地衣芽孢杆菌 CGMCC No.5094	100	100	100	100
嗜酸乳杆菌 CGMCC No.5093	74.7	56.6	26.5	16.6
酿酒酵母 CGMCC No.2388	63.8	48.2	20.8	11.5

[0027] 6) 耐高温测定: 将上述制备的 3 株菌种的培养物, 分别于 50℃、60℃、70℃、80℃ 水

浴处理 15min、30min, 计算存活率。

[0028] 表 33 株菌种在不同高温下处理不同时间的存活率 (%)

[0029]

处理温度	50℃		60℃		70℃		80℃	
处理时间 (min)	15	30	15	30	15	30	15	30
地衣芽孢杆菌 CGMCC No.5094	100	100	100	100	100	100	100	100
嗜酸乳杆菌 CGMCC No.5093	100	87.33	22	16	17	3.2	7.9	0.63
酿酒酵母 CGMCC No.2388	83	53	38	11	13.7	2.2	1.5	0.19

[0030] 7) 耐药性测定 : 采用药敏纸片法。

[0031] 表 43 株菌种的耐药性测定结果

[0032]

药品种 类	药品	浓度 ppm	抑菌圈直径 (mm)
			敏感度

[0033]

				地衣芽孢杆菌 CGMCC No.5094	嗜酸乳杆菌 CGMCC No.5093	酿酒酵母 CGMCC No.2388
第一类	青霉素类	青霉素 G	10μg/片	—	18.60	—
				耐药	耐药	耐药
		阿莫西林	10μg/片	—	26.70	—
				耐药	敏感	耐药
	头孢菌素类	头孢噻肟	30μg/片	24.17	10.89	—
				敏感	耐药	耐药
	氨基糖苷类	庆大霉素	10μg/片	21.33	11.78	—
				敏感	中敏	耐药
		大观霉素	100μg/片	15.24	12.80	—
				中敏	耐药	耐药
	新霉素	30μg/片	22.23	12.50	—	
			敏感	耐药	耐药	
	四环素类	多西环素	30μg/片	22.11	32.02	—
				敏感	敏感	耐药
	大环内脂类	红霉素	15μg/片	—	13.02	—
				耐药	中敏	耐药
吉他霉素		15μg/片	20.40	22.15	—	
			中敏	中敏	耐药	
酰胺醇类	氟苯尼考	30μg/片	22.10	32.57	—	
			敏感	敏感	耐药	

[0034]

	多肽类	杆菌肽锌	0.04IU	—	—	—
				耐药	耐药	耐药
	林可胺类	林可霉素	2 μ g/片	—	13.20	—
				耐药	中敏	耐药
第二类	喹诺酮类	诺氟沙星	10 μ g/片	30.82	12.15	—
				敏感	中敏	耐药
	恩诺沙星	5 μ g/片	22.89	16.57	—	
			敏感	中敏	耐药	
	环丙沙星	5 μ g/片	33.56	12.49	—	
			敏感	耐药	耐药	
磺胺类药	复方磺胺甲基异恶唑	75 μ g/片	39.16	—	—	
			敏感	耐药	耐药	

[0035] 8) 产酶测定:采用中华人民共和国轻工业行业标准,工业用 α -淀粉酶制剂(QB/T1805.1-1993),工业酶制剂通用试验方法(QB/T1803-1993)对地衣芽孢杆菌进行淀粉酶活力测定;采用行业标准:工业用蛋白酶制剂(QB/T1805.3-1993),对地衣芽孢杆菌进行蛋白酶活力测定。

[0036] 地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 淀粉酶活力为:800u/ml;蛋白酶活力为1000u/ml。

[0037] 9) 产酸测定:采用离子色谱法对嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 发酵液进行了产酸测定。

[0038] 产酸结果表明,嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 总有机酸量为 8.2g/L,其中乳酸量为 5.76g/L,乙酸量为 2.03g/L,还有少量的异丁酸。

[0039] 10) 抑菌试验:采用牛津杯法对常见致病菌进行抑菌测定。

[0040] a、在装有 10mL 营养肉汁培养基的试管中活化三株致病菌:K99、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 20h;

[0041] b、双层平板的制备:取直径 90mm 的平板,注入灭菌的营养琼脂 15~20mL,水平放置使之凝固,作为底层,另取营养琼脂(冷至 50 $^{\circ}$ C 左右)与 37 $^{\circ}$ C 240h 培养的指示菌液适量(50mL 培养基加 8mL 左右)混匀,吸取 10mL 浇在底层培养基上,水平放置使之凝固,作为菌层;

[0042] c、加样品:用无菌镊子夹取已灭菌的牛津杯,打开皿盖,放在培养基上。在牛津杯中加满相同量的发酵液上清液(约 200 μ L),每个样品 2 个重复。将加完样的双碟小心放入

37℃恒温箱内,培养 16-18h 后,取出测量抑菌圈大小。

[0043] 表 53 株菌种对常见致病菌的抑菌结果

[0044]

菌株	抑菌圈直径 (mm)		
	大肠杆菌 K88	金黄色葡萄球菌	鸡白痢沙门氏菌
地衣芽孢杆菌 CGMCC No.5094	12.61	19.58	15.62
嗜酸乳杆菌 CGMCC No.5093	16.00	22.99	22.90
酿酒酵母 CGMCC No.2388	0	0	0

[0045] 实施例 2、复合微生态制剂的制备

[0046] 1、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉的制备

[0047] 1) 平板培养复壮:将地衣芽孢杆菌菌种接种于 BPY 平板培养基上,于 37℃培养 24h,使地衣芽孢杆菌复壮,并形成单菌落,挑取单菌落于接种于斜面培养基上,于 37℃培养 36h;

[0048] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养的地衣芽孢杆菌菌种转接茄子瓶斜面培养基上,于 37℃培养 12h,使其处于对数中后期,得一级种子;

[0049] 所述的斜面培养基为 BPY 固体培养基;

[0050] 3) 二级种子的制备:将步骤 2) 制备的一级种子用无菌水制成菌悬液,接种到装有 1.6M³BPY 种子培养基的 2M³种子罐中,温度 37℃,转速 200rpm,罐压 0.05Mpa,通风比:1:0.6~0.8(14.4~19.2M³/h),培养 10~14h,为二级种子液;

[0051] 4) 地衣芽孢杆菌发酵液的制备:将步骤 3) 制备的二级种子液按照 10%的接种量接种到装有 16M³发酵培养基的发酵罐中,温度 37℃,转速 220rpm,罐压 0.05Mpa,通风比:1:0.6~0.8,培养 20h,至芽孢形成率 90%以上,活菌数为 1~2×10¹⁰cfu/ml,则中止发酵,得地衣芽孢杆菌发酵液;

[0052] 所述的发酵培养基为:麸皮 2%,豆粕 1%,氯化钠 0.8%,硫酸镁 0.01%。

[0053] 5) 地衣芽孢杆菌菌粉的制备:在步骤 4) 制备的发酵液中加入 25%的填充物米糠,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 120~130℃,排风温度 40~50℃,雾化器转速 15000~18000rpm,得到水分含量<5%,活菌数≥10⁹cfu/g 的地衣芽孢杆菌菌粉。

[0054] 所述的填充物为:米糠、沸石粉、稻壳粉中的任一种。

[0055] 2、嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉的制备

[0056] 1) 平板培养复壮:将嗜酸乳杆菌菌种接种于 MRS 平板培养基上,于 37℃培养 24h,使嗜酸乳杆菌复壮,并形成单菌落;挑取单菌落接种于斜面培养基上,于 37℃培养 24h;

[0057] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养的嗜酸乳杆菌斜面菌种转接到装有 300ml MRS 培养基的 500ml 三角瓶中,于 37℃培养 12h,转速 100rpm,使其处于对数中后期,为一级种子;

[0058] 3) 二级种子的制备:将步骤 2) 培养的嗜酸乳杆菌一级种子转接到装有 1.6L MRS 培养基的 2.0L 三角瓶中,于 37℃静止培养 12h,为二级种子液;

[0059] 4) 发酵液的制备:将步骤 3) 制备的二级种子液按照 3%的接种量接种到装有

16M³ 发酵培养基的发酵罐中,温度 37℃,转速 120rpm,罐压 0.05Mpa,培养 16h,至活菌数为 2×10^9 cfu/ml,中止发酵;

[0060] 所述的发酵培养基为:葡萄糖 2%,大豆蛋白胨 1%,硫酸铵 0.5%,氯化钠 0.2%,硫酸镁 0.05%。

[0061] 5) 嗜酸乳杆菌菌粉的制备:将步骤 4) 制备的发酵液,5000rpm 离心,得到菌泥,加入与菌泥的重量/体积百分比为 20%的冻干保护剂,混匀,于 -45℃ 冷冻干燥,得到水分含量 < 5%,活菌数 $\geq 10^9$ cfu/g 的嗜酸乳杆菌菌粉;

[0062] 所述的冻干保护剂为:脱脂奶粉、甘油、蔗糖、麦芽糊精和谷氨酸钠的混合物,按照:脱脂奶粉:甘油:蔗糖:麦芽糊精:谷氨酸钠 = 2 : 1.0 : 1.0 : 1.5 : 1.0 的比例混合而成。3、酿酒酵母 CGMCC No. 2388 菌粉的制备

[0063] 1) 平板培养复壮:将冰箱保藏的酿酒酵母斜面菌种采用划线接种的方法在 98 号平板培养基上划线接种,于 30℃ 培养 46h,使酿酒酵母复壮,并形成单菌落;挑取单菌落于新鲜的 98 号斜面培养基上,于 30℃ 培养 36h,放置冰箱备用;

[0064] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养好的酿酒酵母新鲜斜面菌种转接到装有 200ml 98 号培养基的 500ml 三角瓶中,于 30℃ 培养 12 ~ 16h,转速 150rpm,使其处于对数中后期,为一级种子;

[0065] 3) 二级种子的制备:将步骤 2) 培养好的酿酒酵母种子液转接到装有 1.2L 98 号培养基的 2.0L 三角瓶中,于 30℃ 静止培养 12h,为二级种子液;

[0066] 4) 发酵液的制备:将步骤 3) 制备的二级种子按照 10%的接种量接种到装有 15 ~ 16M³ 发酵培养基的发酵罐中,温度 30℃,转速 200rpm,罐压 0.05Mpa,培养 16h 中止发酵,此时活菌数为 1.5×10^9 cfu/ml;

[0067] 所述的发酵培养基为:红糖 1%,大豆蛋白胨 1%,酵母膏 0.2%,氯化钠 0.5%,硫酸镁 0.01%,磷酸氢二钾 0.2%。

[0068] 5) 酿酒酵母菌粉的制备:将步骤 4) 制备的发酵液,2000rpm 离心,得到菌泥,加入与菌泥的重量/体积百分比为 10 ~ 15%的冻干保护剂,混匀后于 -25℃ 冷冻干燥,得到水分含量 < 5%,活菌数 $\geq 10^9$ cfu/g 的酿酒酵母菌粉;

[0069] 所述的冻干保护剂为脱脂奶粉、甘油、麦芽糊精按照:2 : 0.5 : 1 比例混合而成。

4、复合微生态制剂的制备

[0070] 将 1、2、3 制备的地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉、嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、酿酒酵母 CGMCC No. 2388 菌粉和新称取的玉米芯粉,上述各成分的重量配比为:1 : 1 : 2 : 20 混合,得复合微生态制剂。

[0071] 实施例 3 复合预混料的制备

[0072] 每千克复合预混料中含有硫酸亚铁 30g、硫酸铜 10g、硫酸锌 12g、硫酸锰 2g、1% 碘化钾 0.10g、氯化钴 0.30g、1% 亚硒酸钠 0.10g、有机铁 15g、有机铜 5g、有机锌 6g、有机锰 3g、维生素 A0.30g、维生素 D₃4g、维生素 E 3.2g、维生素 K₃0.18g、维生素 B₁0.30g、维生素 B₂0.40 维生素 B₆0.15、维生素 B₁₂0.002g、泛酸 1.5g、烟酸 0.10g、叶酸 0.05g、生物素 0.0102g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 100g、乙氧基喹啉 3g、50% 氯化胆碱 80g、沸石粉 200g,麸皮补足到 1000g。

[0073] 该原料的制备方法:先将维生素、微量元素类用混合机分别预混,然后再按“部分

载体、预混过的微量元素、维生素、复合微生态制剂、剩余载体”的顺序投料进行均匀混合即可。实施例 4 复合预混料的制备

[0074] 每千克复合预混料中含有硫酸亚铁 35g、硫酸铜 12g、硫酸锌 20g、硫酸锰 4g、1%碘化钾 0.15g、氯化钴 0.50g、1%亚硒酸钠 0.15g、有机铁 20g、有机铜 8g、有机锌 15g、有机锰 6g、维生素 A 0.35g、维生素 D₃ 4.5g、维生素 E 3.5g、维生素 K₃ 0.20g、维生素 B₁ 0.40g、维生素 B₂ 0.65g、维生素 B₆ 0.20g、维生素 B₁₂ 0.0022g、泛酸 2.0g、烟酸 0.25g、叶酸 0.08g、生物素 0.015g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 200g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 90g、沸石粉 200g, 麸皮补足到 1000g。

[0075] 该原料的制备方法:先将维生素、微量元素类用混合机分别预混,然后再按“部分载体、预混过的微量元素、维生素、复合微生态制剂、剩余载体”的顺序投料进行均匀混合即可。

[0076] 实施例 5 复合预混料的制备

[0077] 每千克复合预混料中含有硫酸亚铁 40g、硫酸铜 15g、硫酸锌 22g、硫酸锰 6g、1%碘化钾 0.23g、氯化钴 0.6g、1%亚硒酸钠 0.18g、有机铁 25g、有机铜 10g、有机锌 25g、有机锰 10g、维生素 A 0.40g、维生素 D₃ 5g、维生素 E 4g、维生素 K₃ 0.25g、维生素 B₁ 0.50g、维生素 B₂ 0.70g、维生素 B₆ 0.25g、维生素 B₁₂ 0.003g、泛酸 3.0g、烟酸 0.40g、叶酸 0.10g、生物素 0.018g、赖氨酸 140g、复合微生态制剂 150g、乙氧基喹啉 3g、50%氯化胆碱 100g、沸石粉 200g, 麸皮补足到 1000g。

[0078] 该原料的制备方法:先将维生素、微量元素类用混合机分别预混,然后再按“部分载体、预混过的微量元素、维生素、复合微生态制剂、剩余载体”的顺序投料进行均匀混合即可。实施例 6 复合预混料的饲喂效果试验

[0079] 1 材料和方法

[0080] 1.1 本发明实施例 3、4、5 制备的复合预混料

[0081] 1.2 试验地点:唐山大北农猪育种科技有限责任公司

[0082] 1.3 试验设计

[0083] 选取平均体重接近 30kg 的健康猪 12 栏,分为 4 个处理组,每组 3 个重复,即 3 栏,以栏为单位做为一个重复,每栏 6 头猪。称取初重后用 SPSS 软件进行分析,确认各处理间初始重无差异性。饲喂不同饲料的栏交叉排列,消除环境差异。试验期为 40 天。

[0084] 1.4 试验日粮

[0085] 日粮配合参照 NRC (1998) 20 ~ 50kg 瘦肉型猪饲养标准,各试验日粮的基础配方相同,基础日粮配方见表 6。试验日粮分组:A:普通猪用预混料日粮;B-D:实施例 3 ~ 5 复合预混料日粮。

[0086] 表 6 日粮养分组成及营养水平

[0087]

原料	配比%	营养水平	
玉米	68.45	消化能 (MJ/kg)	13.4
次粉	4.00	粗蛋白质 (%)	16.5
豆粕	16.95	赖氨酸 (%)	0.96
棉粕	3.00		
菜粕	4.00		
食盐	0.35		
磷酸氢钙	1.78		
石粉	0.75		
复合预混料	1.0%		

[0088] 1.5 饲养管理

[0089] 按照常规程序和方法进行编号、驱虫和免疫等管理,各组饲养密度相同,商品肉猪自由采食和自由饮水,各组间除日粮不同外,其它条件完全一致。

[0090] 1.6 检测指标

[0091] 1.6.1 生产性能测定

[0092] 于饲养试验第一天和饲养结束称量每头猪的空腹体重,记录初始体重和末体重,计算每头猪日均增重;记录饲养初期及饲养结束的料重,计算每头猪耗料量。

[0093] 料肉比 (F/G) = 消耗饲料总量 / (期末体重 - 初始体重)

[0094] 日均增重 = (期末体重 - 初始体重) / 饲喂天数

[0095] 1.6.2 猪肠道中分泌型 IgA (sIgA) 抗体测定

[0096] 于饲养试验结束时 (第 40 天),每个处理宰杀 6 头猪,解剖取猪小肠肠道内容物,用缓冲液均浆稀释后,采用 Elisa 法检测其 sIgA 抗体水平。

[0097] 1.7 统计分析

[0098] 试验数据运用 SPSS10.0 软件中的 One-way ANOVA 进行统计分析,差异显著时进行 Duncan 多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

[0099] 2. 试验结果

[0100] 表 7 试验育成猪生长性能

[0101]

项目	A	B	C	D
初均重 (kg/头)	28.60	28.55	28.49	29.43
末均重 (kg/头)	62.36 ^b	63.70 ^{ab}	64.45 ^a	66.24 ^a
日均增重 (g/头)	823 ^b	857 ^{ab}	877 ^a	898 ^a
日均采食量 (g/头)	2166	2216	2250	2270
F/G	2.63 ^b	2.59 ^{ab}	2.57 ^{ab}	2.52 ^a
sIgA (OD _{450nm})	1.036 ^c	1.245 ^{bc}	1.872 ^a	1.365 ^b

[0102] 注：同一行数据肩标中无相同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

[0103] 试验结果表明本发明的复合预混料饲喂效果非常理想,其中D组中试验猪平均日增重达 898 克,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),日均增重比对照组提高了 9.1%,而B、C组的体增重与对照组A组相比同样也有提高育成猪体增重的趋势;C、D两种含有微生态制剂的猪用预混料组在料肉比上均显著低于对照组 ($P < 0.05$),其中D组的料肉比数值最低,与对照组料肉比相比降低了 4.1%,这说明D组日粮显著提高了育成猪的饲料转化效率,有助于经济效益的提高(表7)。

[0104] 通过对猪肠道重要防御蛋白 sIgA 抗体水平的测定可知,含有复合微生态制剂日粮处理组显著提高了中猪肠道内 IgA 抗体水平 ($P < 0.05$),而高剂量复合微生态制剂的添加更有助于刺激肠道抗体分泌含量 ($P < 0.01$)。

[0105] 实验结果表明,本发明的含有复合微生态制剂的猪用复合预混料增强了猪肠道局部免疫力,提高了猪机体体液免疫水平,增强抵抗力,有助于减少猪病的发生,维护动物健康,从而更大程度地发挥猪的生长潜力,提高养殖户经济效益(表7)。