



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102876614 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210392858. 8

A23K 1/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 16

A23K 1/00 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/10 (2006. 01)

CGMCC No. 5350 2011. 09. 30

(71) 申请人 北京龙科方舟生物工程技术有限公司

地址 100107 北京市海淀区圆明园西路 2 号
中国农业大学西校区国家饲料工程技术研究中心

(72) 发明人 谯仕彦 丁修良 王劲松 宋青龙
张海燕

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页

序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一株地衣芽孢杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株地衣芽孢杆菌及其应用。本发明所提供的地衣芽孢杆菌具体为地衣芽孢杆菌(Bacillus Licheniformis)C30-2,它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 5350。实验证明,本发明的地衣芽孢杆菌(Bacillus Licheniformis)C30-2CGMCC No. 5350 抗逆性强、抗杂菌能力强,本发明将其进行乳化制备得到地衣芽孢杆菌制剂,可以作为添加剂用于制备动物饲料,可替代现有动物日粮中的抗生素,调节动物肠内微生态平衡,从而具有增强非特异性免疫功能来预防疾病的作用,同时还可以提供营养因子、促进营养物的消化吸收、降低腹泻、促进动物生长和提高饲料转化率。

1. 地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2, 它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 5350。

2. 一种地衣芽孢杆菌制剂, 其活性成分为权利要求 1 所述的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350。

3. 一种动物饲料添加剂, 其活性成分为权利要求 1 所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350。

4. 含有权利要求 3 所述动物饲料添加剂的动物饲料。

5. 一种抑菌产品, 其活性成分为权利要求 1 所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350。

6. 权利要求 1 所述的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 在如下至少一种中的应用:

a) 制备地衣芽孢杆菌制剂;

b) 制备动物饲料添加剂;

c) 制备动物饲料;

d) 制备抑菌产品;

e) 促进猪或者鸡的生长。

7. 一种制备地衣芽孢杆菌制剂的方法, 包括如下步骤:

1) 发酵地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350, 浓缩发酵液, 得到菌泥;

2) 将步骤 1) 得到的菌泥与麦芽糊精混匀, 即得到地衣芽孢杆菌制剂。

8. 一种制备动物饲料添加剂的方法, 包括如下步骤:

1) 发酵地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350, 浓缩发酵液, 得到菌泥;

2) 将步骤 1) 得到的菌泥与麦芽糊精混匀, 即得到动物饲料添加剂。

9. 一种制备抑菌产品的方法, 包括如下步骤: 发酵权利要求 1 所述的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350, 收集发酵产物, 得到所述抑菌产品。

10. 权利要求 2 所述地衣芽孢杆菌制剂在作为动物饲料添加剂或抑菌产品中的应用。

一株地衣芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一株地衣芽孢杆菌及其应用。

背景技术

[0002] 随着人们对健康和生态环境的高度重视,无毒、无残留及无抗药性的绿色饲料添加剂成为研究热点。益生菌是有利于宿主肠道微生物平衡的活菌食品或饲料添加剂,要求抗消化道内环境,定植于消化道表面,产生有用的酶类和有机酸等代谢产物,在加工和贮存过程中保持活性等。作为绿色饲料添加剂的益生菌种类很多。美国 FDA (1989) 认为,安全的微生物菌株共 42 种,农业部 658 公告中公布了 16 种,地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 是其中一种。

[0003] 地衣芽孢杆菌主要通过以下几方面发挥作用:1) 颌颌动物病原细菌并维持和调整肠道微生态平衡。2) 产生多种酶类并提高动物消化酶活性,促进动物对营养物质的消化吸收。3) 增强动物体的免疫功能,抵御感染。研究证明,地衣芽孢杆菌确实是一种高效且安全的新型饲料添加剂。目前,国内的研究多集中于研制产品和应用效果,而按益生菌的特定要求来选育性能优良的菌种,研究菌株生物特性方面的报道很少。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种地衣芽孢杆菌及其应用。

[0005] 本发明所提供的地衣芽孢杆菌为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2, 该菌株已于 2011 年 09 月 30 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, 地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号), 其保藏编号为 CGMCCNo. 5350。

[0006] 本发明的另一个目的是提供一种地衣芽孢杆菌制剂。

[0007] 该地衣芽孢杆菌制剂除包含作为活性成分的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 外, 还可包括辅料, 如稻壳粉、麦芽糊精、石粉、豆粕等。

[0008] 本发明的再一个目的是提供一种动物饲料添加剂。

[0009] 该动物饲料添加剂的活性成分为所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350。

[0010] 含有所述动物饲料添加剂的动物饲料也属于本发明的保护范围。

[0011] 本发明的又一个目的是提供一种抑菌产品。

[0012] 该抑菌产品的活性成分为所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350。

[0013] 本发明所提供的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 在如下至少一种中的应用也属于本发明的保护范围:

[0014] a) 制备地衣芽孢杆菌制剂;

[0015] b) 制备动物饲料添加剂；

[0016] c) 制备动物饲料；

[0017] d) 制备抑菌产品；

[0018] e) 促进猪或者鸡生长。

[0019] 在本发明的一个实施例中,所述动物具体为猪或鸡。所述促进动物生长具体可体现在如下 1) 或 2)：

[0020] 1) 提高动物猪平均日增重、提高猪平均日采食量、提高猪皮毛指数、降低猪料肉比和 / 或降低猪腹泻率；

[0021] 2) 提高鸡平均日增重和 / 或提高平均日采食量。

[0022] 制备所述地衣芽孢杆菌制剂的方法也属于本发明的保护范围。

[0023] 该方法包括如下步骤：

[0024] 1) 发酵地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350, 浓缩发酵液, 得到菌泥；

[0025] 2) 将步骤 1) 得到的菌泥与麦芽糊精混匀, 即得到地衣芽孢杆菌制剂。

[0026] 在上述方法步骤 1) 中, 所述发酵地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350, 浓缩发酵液, 得到菌泥, 具体为通过将所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 的发酵液进行蒸发, 至含水量 50-60%, 得到所述菌泥。

[0027] 在上述方法步骤 1) 中, 所述发酵的温度为 15℃ -45℃, 所述发酵的时间为 10-30 小时, 所述发酵所需的 pH 值为 6.4-6.6, 所述发酵的压力为 0.08Mpa-0.14Mpa, 发酵过程中的通气量为 0.8-1.0V / V·min, 所述通气量以每分钟内通过单位体积培养液的气体积来表示。

[0028] 在本发明的一个实施例中, 所述发酵的温度具体为 30℃、15℃ 或 45℃, 所述发酵的时间具体为 28-30 小时、10 小时或 18 小时。

[0029] 在上述方法步骤 2) 中, 所述菌泥与所述麦芽糊精的配比为 $(3-8) \times 10^{11}$ cfu : 1g。

[0030] 在上述方法步骤 1) 中, 所述发酵采用的培养基按照如下方法制备: 将蔗糖、豆粕、NaCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄·3H₂O、MnSO₄、MgSO₄·7H₂O 和水混匀, 得到培养基, 所述蔗糖在所述发酵培养基中的浓度为 35g/L-45g/L, 所述豆粕在所述发酵培养基中的浓度为 35g/L-45g/L, 所述 NaCl 在所述发酵培养基中的浓度为 1g/L-5g/L, 所述 K₂HPO₄ 在所述发酵培养基中的浓度为 0.1g/L-0.5g/L, 所述 KH₂PO₄·3H₂O 在所述发酵培养基中的浓度为 0.05g/L-0.5g/L, 所述 MnSO₄ 在所述发酵培养基中的浓度为 0.1g/L-0.5g/L, 所述 MgSO₄·7H₂O 在所述发酵培养基中的浓度为 0.01g/L-0.1g/L。

[0031] 在本发明的实施例中, 上述蔗糖在所述发酵培养基中的浓度具体为 35g/L、40g/L 或 45g/L, 所述豆粕在所述发酵培养基中的浓度具体为 35g/L、40g/L 或 45g/L, 所述 NaCl 在所述发酵培养基中的浓度具体为 1g/L、2g/L 或 5g/L, 所述 K₂HPO₄ 在所述发酵培养基中的浓度具体为 0.1g/L、0.4g/L 或 0.5g/L, 所述 KH₂PO₄·3H₂O 在所述发酵培养基中的浓度具体为 0.1g/L、0.4g/L 或 0.5g/L, 所述 MnSO₄ 在所述发酵培养基中的浓度具体为 0.1g/L、或 0.5g/L, 所述 MgSO₄·7H₂O 在所述发酵培养基中的浓度具体为 0.01g/L 或 0.05g/L; 所述发酵培养基的 pH 为 6.0-6.8, 或 6.0-6.4, 或 6.6-6.8。

[0032] 在上述方法中,在所述步骤 2) 后,还包括将乳化产物干燥得到地衣芽孢杆菌制剂的步骤,其中干燥采用低温真空干燥箱在低温温度 27-50℃,真空度 -0.096Mpa 条件下进行。

[0033] 制备所述动物饲料添加剂的方法也属于本发明的保护范围。

[0034] 该方法与上述制备所述地衣芽孢杆菌制剂的方法相同,也包括如下步骤:

[0035] 1) 发酵地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350,浓缩发酵液,得到菌泥;

[0036] 2) 将步骤 1) 得到的菌泥与麦芽糊精混匀,即得到动物饲料添加剂。

[0037] 在上述的动物饲料添加剂制备方法中,所述动物具体可为猪或鸡。

[0038] 制备所述抑菌产品的方法也属于本发明的保护范围。

[0039] 该方法包括如下步骤:发酵所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350,收集发酵产物,得到所述抑菌产品。

[0040] 在上述抑菌产品的制备方法中,所述发酵的温度可为 35℃ -37℃。在本发明的一个实施例中具体为 37℃。

[0041] 在上述抑菌产品的制备方法中,所述发酵时间可为 15h-80h。在本发明的一个实施例中具体为 30h 或 20h。

[0042] 在上述抑菌产品的制备方法中,所述发酵的培养基具体为 MRS 肉汤培养基;所述 MRS 肉汤培养基的 pH 值为 6.0-6.4。

[0043] 所述地衣芽孢杆菌制剂在作为动物饲料添加剂或抑菌产品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0044] 在本发明中,所有所述抑菌产品均具体可为药物或菌剂;所述抑菌均具体可为抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、化脓杆菌(*Bacillus pyogenes*)、梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovi*)、魏氏梭菌(*Clostridium welchii*)、藤黄球菌(*Micrococcus luteus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中的至少一种。

[0045] 在本发明中,所有所述动物均具体可为猪或鸡。

[0046] 本发明通过分离、鉴定、筛选,得到地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350,其抗逆性强、抗杂菌能力强、具有益生特性,本发明将其进行乳化制备得到地衣芽孢杆菌制剂,可以作为添加剂用于制备动物饲料,其中的动物包括但不限于猪、鸡、牛、羊等各种动物。该饲料具有与抗生素饲料类似的功能,但无抗生素饲料的副作用。本发明的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 主要作为动物饲料的添加剂,可替代现有动物日粮中的抗生素,调节动物肠内微生态平衡,从而具有增强非特异性免疫功能来预防疾病的作用,同时还可以提供营养因子、促进营养物的消化吸收、降低腹泻、促进动物生长和提高饲料转化率、提高断奶仔猪以及生长育肥猪的生产性能。本发明的地衣芽孢杆菌对防治动物消化系统疾病起到保健作用,同时对幼年动物可刺激其胃肠道发育,所以将之作为饲料添加剂应用在饲料中能起到抗病促生长的作用。同时,本发明的地衣芽孢杆菌无耐药性和药物在动物产品中残留,不会对人类的健康产生潜在的

危害,是一种有前途的绿色饲料添加剂。

附图说明

[0047] 图 1 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 的耐酸性检测结果。

[0048] 图 2 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 的耐胆盐检测结果。

[0049] 图 3 为测定蛋白酶活性的酪氨酸标准曲线。

[0050] 图 4 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 的生长曲线。

[0051] 保藏说明

[0052] 菌种名称 :地衣芽孢杆菌

[0053] 拉丁名 :(*Bacillus Licheniformis*)

[0054] 菌株编号 :C30-2

[0055] 保藏机构 :中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0056] 保藏机构简称 :CGMCC

[0057] 地址 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号

[0058] 保藏日期 :2011 年 09 月 30 日

[0059] 保藏中心登记入册编号 :CGMCC No. 5350

具体实施方式

[0060] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0061] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0062] 下述实施例中所用的培养基如无特殊说明配方如下 :

[0063] (1) MRS 肉汤培养基

[0064] 蛋白胨 10g,牛肉粉 5g,葡萄糖 20g,吐温 801ml,磷酸氢二钾 2g,乙酸钠 5g,柠檬酸三氨 2g,七水硫酸镁 0.2g,四水硫酸锰 0.05g,酵母粉 4g,用蒸馏水定容至 1L, pH 6.0-6.4。

[0065] (2) MRS 琼脂培养基

[0066] 1L 上述的 MRS 肉汤培养基中加入琼脂 15g, pH6.3-6.7。

[0067] (3) M17 琼脂培养基

[0068] 大豆蛋白胨 5.0g,酵母提取物 5.0g,酪蛋白胨 5g,抗坏血酸 0.5g,牛肉浸膏 2.5g,β-甘油磷酸二钠 19g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25g,琼脂 15g,用蒸馏水定容至 1L, pH6.6-6.9。

[0069] 实施例 1、地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 的分离及鉴定

[0070] 一、菌株 C30-2 的分离与筛选

[0071] 1、菌株的分离培养

[0072] 取 1g 中国北京的农田土壤样品于装有 9mL 无菌生理盐水的试管中,漩涡器震荡混匀,即为 1:10 稀释液,再取稀释液进行十倍递增稀释,然后选择 3 个适宜梯度的稀释液各 1mL 涂布于含有 10ppm 放线菌酮的 MRS 琼脂培养基及 M17 琼脂培养基,37℃ 厌氧培养 48 ~ 72h,观察并记录菌落形态,挑取长势良好的特征单菌落于 MRS 肉汤培养基中,进行划线分

离纯化。观察肉汤是否变浑浊,有浑浊的菌悬液放置 4℃ 冰箱贮藏,进一步进行下述紫外诱变筛选实验。

[0073] 2、菌株的紫外诱变与筛选

[0074] 将经灭菌的固体 LB 培养基倒入底部平整的平皿中,待凝固后取适量步骤 1 制备的菌悬液涂布于平板上,培养 12h 后,在距离 20cm 的紫外灯下诱变 30s。获得诱变后的菌株。

[0075] 挑选诱变后的菌株接种于 LB 液体培养基中培养 24h,然后取适量诱变后的菌悬液涂布于平板上,每平皿控制菌落在 30-50 个,在 37℃ 下继续培养至 24h (各菌落产生的代谢产物最大量时),将琼脂块取出置于涂布有金黄色葡萄球菌的检测平皿上,37℃ 培养一段时间,以野生地衣芽孢杆菌为对照,测量并比较琼脂块周围形成的抑菌圈大小。对抑菌能力明显增大的菌株(抑菌圈大约 10mm)进一步通过琼脂孔扩散法测定菌株的抑菌能力。选取抑菌圈在 15mm 以上的菌株进一步进行革兰氏染色实验。

[0076] 3、菌株的革兰氏染色

[0077] 用无菌注射器吸取少量含有步骤 2 所得菌株的 MRS 肉汤培养物,滴在载玻片上,在酒精灯火焰上轻轻烘干固定。滴加结晶紫染色液,染 1min,水洗;滴加革兰氏碘液媒染,作用 1min,水洗;滴加丙酮乙醇混合液(丙酮:95%乙醇=3:7,体积比)脱色 30s,水洗;滴加沙黄染色液复染 1min,水洗,待干,在普通光学显微镜上观察,若菌体呈红色为阴性,呈紫色为阳性。选取呈革兰氏阳性,且形态一致的杆菌,进一步进行下述接触酶试验。

[0078] 4、菌株的接触酶试验

[0079] 做 MRS 斜面培养基,取含有步骤 3 所得菌株的 MRS 肉汤培养物约 0.2 mL 注入装有 MRS 琼脂培养基斜面,5%CO₂ 培养箱,37℃ 培养 24h,长出菌落后,将 3% 过氧化氢溶液滴加到菌落上,若没有气泡产生说明是阴性,若有气泡产生说明是阳性。

[0080] 通过步骤 1-4 的分离与筛选最终获得 1 株对金黄色葡萄球菌抑制能力明显增强,革兰氏染色成阳性,接触酶反应也为阳性的菌株。将该菌株编号为 C30-2。

[0081] 二、菌株 C30-2 的鉴定

[0082] 从以下几个方面鉴定步骤一分离并筛选得到的菌株 C30-2 具体属于哪种菌。

[0083] 1、形态学鉴定

[0084] 一方面,将处于对数生长期,且菌落大小稳定,上述步骤一分离并筛选得到的菌株 C30-2 进行单菌落状态描述,主要包括菌落的大小、颜色、透明度、湿润度、菌落表面状态(是否平坦、突起、褶皱、凹陷等)、菌落边缘状态(是否整齐、不规则、放射状等)。另一方面,对处于对数生长期的所述菌株 C30-2,经涂片染色后采用光学显微镜观察菌体的形态。

[0085] 分离并筛选得到的菌株 C30-2 的细胞为杆状,细胞直径大于 1 μm,有芽孢形成,芽孢不膨大,革兰氏染色阳性。

[0086] 2、生理生化特征测定

[0087] 菌株 C30-2 的生理生化特征测定结果如表 1 所示:

[0088] 表 1 菌株 C30-2 的生理生化特征

	试验项目	结果	试验项目	结果
[0089]	氧化酶	+	木糖	+
	厌氧生长	+	甘露醇	+
	VP 试验	+	乳糖	-
	MR 试验	+	淀粉水解	+
	VP 菌液 pH>7	-	酪素水解	-
	VP 菌液 pH<6	+	利用柠檬酸盐	+
	pH5.7 生长	+	硝酸盐还原	+
[0090]	碳水化合物产酸	+	50℃生长	+
	葡萄糖	+	7%NaCl 生长	+
	阿拉伯糖	+		

[0091] 注：“+”表示结果阳性；“-”表示结果阴性。

[0092] 3、16SrDNA 序列同源性分析

[0093] 采用菌落 PCR 方法扩增步骤一所得的菌株 C30-2 的 16SrDNA 片段。细菌总 DNA 的提取采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, Tiangen DP302-02)提取。16SrRNA 扩增引物采用细菌通用引物,其引物序列为:正向引物为 27f(对应于 *Escherichia coil* 第 8-27 位碱基):5' -AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3' ;反向引物为 1495r (对应于 *Escherichia coil* 第 1495-1515 位碱基):5' -CTACGGCTACCTGTTACGA-3' 。反应体系(50 μL):10×PCR buffer 5 μL ;MgCl₂ (25mM)4 μL ;dNTP MIX (2.5mM each)4 μL ;引物 27f (10pmol/μL) 2 μL ;引物 1495r (10pmol/μL) 2 μL ;基因组 DNA 模板 (100ng/μL) 2 μL ; TaKaRa ExTaq 酶 (5U/μL)0.6 μL ;ddH₂O 补充至 50 μL。PCR 扩增程序:95℃预变性 5min ;94℃变性 1min,58℃退火 1min,72℃延伸 2min,进行 30 个循环;最后 72℃延伸 10min。

[0094] PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度约 1500bp 的阳性产物经纯化后送中美泰和生物技术(北京)有限公司进行序列测定,其序列为序列表中序列 1。将序列 1 在 GenBank 数据库中进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)同源性比对,确定菌种类别。

[0095] 上述形态、生理生化特征分析和 16srDNA 序列同源性分析结果表明该菌为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)。该菌株已于 2011 年 09 月 30 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,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 5350,其分类命名为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2。

[0096] 实施例 2、地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 的抗逆性检测

[0097] 一、耐热性检测

[0098] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 按 2% (v/v) 的接种量(3.75×10^{10} cfu/ml)接种到 MRS 肉汤培养基中,共六份,于 85℃水浴锅内分别处理

10min、15min、20min、30min、40min、60min 后,利用 MRS 琼脂平板 37℃ 恒温培养 24h 后,采用平板倾注法测定其活菌数。

[0099] 结果如表 2 所示,地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 在 85℃ 处理 10min 后存活率仍达 93.33%,处理 15min,存活率达 24%。证明该菌株耐热性能较好。一般仔猪饲料的制粒温度为 70℃~85℃ 之间,耐高温之后存活率低也是乳酸菌作为饲料添加剂的主要限制性因素之一。从耐热存活率看,本发明选育的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 可以耐受制粒时的高温,作为饲料添加剂将会有较好的前途。

[0100] 表 2 耐热试验结果

	处理时间	活菌数 (cfu/ml)	存活率 (%)
	10min	3.50×10^{10}	93.33
	15min	9.0×10^9	24.00
[0101]	20min	9.0×10^8	2.40
	30min	2.3×10^8	0.61
	40min	2.1×10^8	0.56
	60min	2.0×10^8	0.53

[0102] 二、耐酸性检测

[0103] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 按 2% (v/v) 的接种量接种到 pH 值为 2.0、2.5、3.0 的 MRS 肉汤培养基中,分别在 0h、1h、2h、3h 采用平板倾注法测定其活菌数。

[0104] 结果如图 1 所示,pH 值为 3 及 2.5 时,对地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 活性影响较小,而当 pH=2.0 时活菌数发生明显的下降。这个存活率对于其耐过胃酸的抑制作用或杀灭作用应是较为理想的。

[0105] 三、耐胆盐检测

[0106] 将活化好地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 用无菌生理盐水做倍比稀释,选取合适的稀释梯度并吸取 1mL 稀释液放于灭菌过的平皿内,做 6 个重复,然后用含 0.30%、1.0%、及 2.0% (% 表示 g/100ml) 牛胆酸钠的 MRS 固体培养基倾注平板,37℃ 培养 3h,每隔 1h 进行菌落计数,作为试验组;同时用不含牛胆酸钠的 MRS 固体培养基倾注平板,37℃ 培养 48h,菌落计数,作为对照组。计算菌株的存活率。

[0107] 结果如图 2 所示,地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 对胆盐具有良好的耐受能力,在各胆盐浓度下 3 小时培养均出现轻微的生长。另外,在预试验时观察到地衣芽孢杆菌在胆盐浓度在 0.1%-0.3% (% 表示 g/100ml) 范围内生长基本不受影响。

[0108] 四、抗生素抗性检测

[0109] 将各种抗生素按表 3 所列溶剂溶解,滤菌后按试验所需用量无菌加入到灭菌的 MRS 肉汤培养基中,将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 按 2% (v/v) 的接种量接种到含不同含量抗生素的 MRS 肉汤培养基中,37℃ 培养 24h,观察其菌

落生长情况。

[0110] 表 3 各种抗生素种类、用量及试验结果

[0111]

抗生素	溶剂	用量 (ppm)	生长状况	抗生素	溶剂	用量 (ppm)	生长状况
喹乙醇	热水	100	-	泰乐菌素	热水	50	-
牛至油	水	100	+	磺胺二甲嘧啶	热乙醇	200	+
洛克沙砷	甲醇	100	+	三甲氧苄氨嘧啶	冰醋酸	200	-
杆菌肽	水	80	+	金霉素	乙醇	150	+
阿散酸	热水	200	+	抗敌素	水	100	+
乙酰甲喹	氯仿	50	-	吉他霉素	氯仿	150	-
速大肥	甲醇	50	-				

[0112] 注：“+”表示菌体生长；“-”表示菌体不生长。

[0113] 结果如表 3 所示，地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 对牛至油、洛克沙砷、杆菌肽、阿散酸、磺胺二甲基嘧啶、黄霉素、金霉素、抗敌素等 7 种抗生素具有抗性，而对其他的抗生素敏感。这一结果表明地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 具有良好的耐药性。

[0114] 实施例 3、酶活检测及抑菌试验

[0115] 本实施例所涉及的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CVCC1882, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、大肠杆菌(*E. coli*) K88 (大肠埃希氏菌) (CMCC44742, 中国医学细菌保藏管理中心)、大肠杆菌(*E. coli*) 0157 (购自中国兽药监察所)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、化脓杆菌(*Bacillus pyogenes*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovi*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、魏氏梭菌(*Clostridium welchii*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、藤黄球菌(*Micrococcus luteus*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, 国家兽医微生物菌种保藏中心)

[0116] 一、蛋白酶活性测定

[0117] 参照国家行业标准 SB/T 10317-1999 (蛋白酶活力测定法) 对地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 发酵液中蛋白酶活性进行了测定。所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 发酵液共有如下四

种：在 37℃ 分别培养 20h 和 30h 的 MRS 发酵液(MRS 肉汤培养基),以及在 37℃ 分别培养 20h 和 30h 的 LB 发酵液(LB 液体培养基),四种发酵液中,所述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 的初始接种量均为 3.75×10^{10} cfu/mlcfu/ml。

[0118] 蛋白酶活力测定的具体步骤如下:将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 发酵液置于 40℃ 水浴中预热 2min,再加入经同样预热的酪蛋白 1mL,精确保温 10min,然后再立即加入 0.4mol/L 的三氯乙酸水溶液 2mL,以终止反应,继续置于水浴中保温 20min,使残余蛋白质沉淀后离心,取 1mL 上清液,再加 0.4mol/L 的碳酸钠水溶液 5mL,以及福林试剂(向 2000mL 的磨口回流瓶中加入 100g 钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、25g 钼酸钠及 700mL 的去离子水,再加入 50mL 浓度为 85% 的磷酸及浓盐酸 100mL,充分混合后,接上回流冷凝管,以文火回流 10h,结束后再加入 150g 的硫酸锂 (LiSO_4)、50mL 去离子水及数滴溴水,再继续沸腾 15min,以驱除过量的溴,冷却后滤液呈黄绿色(如仍呈绿色,需再重复滴加溴水的步骤),加去离子水定容至 1000mL 处,过滤,滤液置于棕色试剂瓶中,贮于冰箱中可长期保存备用)1mL 摇匀,40℃ 保温发色 20min 后测定 660nm 下的吸光值。然后根据绘制的酪氨酸标准曲线,计算其蛋白酶活性。在 40℃ 下每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸,定义为 1 个蛋白酶活力单位,即 1U。

[0119] 根据 SB/T 10317-1999 绘制酪氨酸标准曲线,如图 3 所示,回归方程为 $y=110.17x-0.5637$,回归系数为 0.9996,线性范围 0-100mol/L。经测定,地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 在 37℃ 培养 20h 的 MRS 发酵液中的蛋白酶活性为 147.16U,培养 30h 为 196.05U;在 37℃ 培养 20h 的 LB 发酵液中其蛋白酶活性为 142.07U,培养 30h 为 134.57U,培养 40h 为 151.65U。初步判定该蛋白酶为碱性蛋白酶。

[0120] 二、生长曲线测定

[0121] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 按 1% (v/v) 的接种量接种到 MRS 肉汤培养基中,37℃ 培养 18h,以不加供试菌液的 MRS 肉汤培养基为空白对照,每隔一小时测定其 OD600。实验设三次重复,结果取三次重复的平均值。记录数据并绘制生长曲线。

[0122] 绘制的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 的生长曲线如图 4 所示,在培养第 5 小时地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCCNo. 5350 菌株生长进入对数期,此时活菌数开始迅速上升,于第 11 小时进入稳定期,于第 13 小时活菌数达到最大 6.6×10^8 cfu/mL。

[0123] 三、与致病菌混合培养试验

[0124] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 接种到 MRS 肉汤培养基中,37℃ 培养 24h 后,取 5mL 培养物(1.42×10^9 CFU/mL)分别与 5、10、15mL MRS 肉汤培养基混合,制成 3 个含不同地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCC No. 5350 浓度的营养肉汤,分别接种伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 K88 和大肠杆菌 0157,接种量为培养液体积的 10%,置 37℃,2.5% (v/v) 的 CO₂ 培养箱培养 24h。对于四种致病菌和地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 均设置与混合培养中等浓度的单独培养对照组。将各个培养物进行梯度稀释,从而计各培养物中各菌的活菌数。其中,地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 采用 MRS 琼脂培养基计数,各致病菌则分别使用各自选择性培养基进行计数,计算各平皿的菌落数,

实验设三次重复,结果以平均值表示。

[0125] 地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 与四种致病菌混合培养前后,以及单独培养的活菌数检测结果见表 4。由表 4 可知地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 对金黄色葡萄球菌和伤寒沙门氏菌具有较强的杀灭作用。经 24 小时培养后金黄色葡萄球菌活菌数为 0,伤寒沙门氏菌的活菌数在共同培养后下降到 4.60×10^3 cfu/mL;而对大肠杆菌 K88 及大肠杆菌 O157 没有抑制作用。

[0126] 表 4 与致病菌混合培养的试验结果

菌株名称	活菌数 (cfu/mL)		
	混合培养前	混合培养后	单独培养
大肠杆菌 K88	3.60×10^8	$>10^7$	4.20×10^8
大肠杆菌 O157	4.40×10^8	$>10^7$	2.60×10^8
伤寒沙门氏菌	6.20×10^8	4.60×10^3	3.40×10^8
金黄色葡萄球菌	1.90×10^8	0	1.90×10^8
地衣芽孢杆菌 C30-2	1.42×10^9	2.45×10^8	8.75×10^8

[0128] 注:地衣芽孢杆菌 C30-2 即表示地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350。

[0129] 四、抑菌试验

[0130] 将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 K88、大肠杆菌 O157、伤寒沙门氏菌、化脓杆菌、梅氏弧菌、魏氏梭菌、藤黄球菌、肺炎链球菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌作为指示菌,用 LB 液体培养基 37℃ 培养 18h 后(其浓度约为 10^8 CFU/mL),进行倍比稀释,取合适稀释度的 1mL 稀释液(浓度约为 5×10^7 CFU/mL)与 10ml 的 MRS 琼脂培养基混匀倒平板。待培养基凝固后,将灭菌的不锈钢牛津杯(外径为 8.0mm)放到含有不同指示菌的培养基上,向其中加入步骤一所述的 37℃ 培养 30h 的地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 的 MRS 发酵液(1.42×10^9 cfu/ml)的无细胞上清液 200 μ L,每个样品做 3 个重复,结果取 3 个重复的平均值。同时设以 200 μ LMRS 肉汤培养液代替地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 发酵液无细胞上清液的对照,37℃ 有氧培养,待出现明显抑菌圈后测定抑菌圈直径。

[0131] 结果如表 5 所示,地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2 CGMCC No. 5350 的发酵上清液抑菌谱较广,对所选用的指示菌具有较强的抑制作用。不仅对金黄色葡萄球菌,植物乳杆菌,魏氏梭菌等革兰氏阳性菌具有抑制作用,同时对伤寒沙门氏菌,粪肠球菌,梅氏弧菌等革兰氏阴性细菌也具有抑制作用,而对大肠杆菌 K88 和大肠杆菌 O157 的生长没有抑制。

[0132] 表 5 地衣芽孢杆菌发酵液上清对常见致病菌牛津杯法抑菌试验结果

[0133]

指示菌株	地衣芽孢杆 C30-2
金黄色葡萄球菌	+++

大肠杆菌 K88	-
大肠杆菌 0157	-
伤寒沙门氏菌	+
化脓杆菌	+++
梅氏弧菌	+
魏氏梭菌	++
藤黄球菌	+++
肺炎链球菌	+
巨大芽孢杆菌	+
短小芽孢杆菌	+++
植物乳杆菌	++
嗜热链球菌	+++
枯草芽孢杆菌	+++
粪肠球菌	++

[0134]

[0135] 注 :+ 表示抑菌圈直径 <10mm ;++ 表示抑菌圈直径 10 ~ 15mm ;+++ 表示抑菌圈直径 >15mm ;- 表示无抑菌作用。地衣芽孢杆菌 C30-2 即表示地衣芽孢杆菌(Bacillus Licheniformis) C30-2CGMCC No. 5350。

[0136] 实施例 4、地衣芽孢杆菌制剂的制备及其稳定性检测

[0137] 一、制备地衣芽孢杆菌制剂的菌种液载体的选择

[0138] 候选菌种液载体有三种,分别为麦芽糊精(C1960,上海源聚生物科技有限公司)、海藻糖(C2072,上海源聚生物科技有限公司)和阿拉伯树胶(232-519-5,诺瑞沃(北京)食品有限公司)。

[0139] 检测上述三种菌种液载体在地衣芽孢杆菌制剂的长期稳定性方面的效果,具体操作如下:将地衣芽孢杆菌(Bacillus Licheniformis)C30-2CGMCC No. 5350 接种于 MRS 肉汤培养基,并用醋酸调节 pH 至 6.3,置普通培养箱 37℃ 培养 24 小时后,用无菌水梯度稀释,得到浓度为 10^{10} cfu/ml 的菌种液。将上述菌种液离心收集菌体与三种候选菌种液载体分别单独混匀,或与这三种菌种液载体一同混匀,在室温(25℃)下乳化 30 分钟,得到如下四组制剂:

[0140] 麦芽糊精组制剂:将菌种液、麦芽糊精和水混匀乳化得到,菌体、麦芽糊精和水的

质量配比为 10 :1 :10。

[0141] 海藻糖组制剂 :将菌种液、海藻糖和水混匀乳化得到,菌体、海藻糖和水的质量配比为 10 :1 :10。

[0142] 阿拉伯树胶组制剂 :将菌体、阿拉伯树胶和水混匀乳化得到,菌种液、阿拉伯树胶和水的质量配比为 10 :1 :10。

[0143] 麦芽糊精+海藻糖+阿拉伯树胶组制剂 :将菌种液、麦芽糊精、海藻糖、阿拉伯树胶混匀乳化得到,菌体、麦芽糊精、海藻糖、阿拉伯树胶和水质量比为 10 :1 :0.5 :0.3 :10。

[0144] 在上述四组制剂制备完时立刻测量菌种活力(通过制剂中菌种的浓度体现),然后常温(25℃)下分别放置 1、6、12、18 个周后,再分别测量菌种活力;计算放置后菌种活力占放置前菌种活力的百分比。

[0145] 结果如表 6 所示,以麦芽糊精作载体的制剂与其他组相比,稳定性最好,这一结果表明麦芽糊精更适合作为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2 CGMCCNo. 5350 的菌种液载体。

[0146] 表 6 不同菌种液载体吸附所制得的制剂的长期稳定性研究

载体	1 个周	6 个周	12 个周	18 个周
麦芽糊精	97.5%	93.4%	82.9%	76.6%
[0147] 海藻糖	95.2%	85.7%	71.9%	62.7%
阿拉伯树胶	94.3%	90.2%	89.7%	64.1%
麦芽糊精+海藻糖+阿拉伯树胶	91.3%	87.7%	80.6%	62.3%

[0148] 二、地衣芽孢杆菌制剂制备

[0149] 根据上述步骤一的实验结果,以麦芽糊精作为地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 的菌种液载体,制备地衣芽孢杆菌制剂。

[0150] 方法一 :

[0151] 发酵培养基配方 :蔗糖 40g/L,豆粕 40g/L,NaCl 2g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1g/L, $MnSO_4 \cdot 0.5g/L$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L,加水充分溶解,pH6.6-6.8。所述浓度均为各物质在培养基中的终浓度。

[0152] 整个地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 发酵生产流程具体操作如下 :

[0153] 1) 发酵空罐灭菌

[0154] 在温度 121℃,罐压 0.09-0.15Mpa 的条件下进行发酵空罐灭菌,维持时间为 20-40 分钟,并保持流通蒸汽;最后降温至 37℃。

[0155] 2) 发酵实罐灭菌

[0156] 将发酵培养基放入发酵罐中,在温度 121℃、罐压 0.08-0.15Mpa,保持流通蒸汽条件下灭菌维持时间 30 分钟。

[0157] 3) 发酵培养

[0158] 将地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 接种于 MRS 培养基,并用醋酸调节 pH 至 6.7,置普通培养箱 37℃培养 24 小时后,用无菌水梯度稀释,得到

浓度为 10^{10} cfu/ml 的菌种液。

[0159] 在发酵罐内温度为 30℃ 的条件下,将上述地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 的菌种液按照体积比为 1:100 的接种量接种发酵罐培养基中;在温度 30℃、罐压 0.08-0.14Mpa、通气量 0.8-1.0V / V · min,所述通气量以每分钟内通过单位体积培养液的气体体积比来表示,pH6.4-6.6,溶解氧(DO) \geq 25% 的条件下发酵 28-30 小时,在液体菌数 $\geq 2.0 \times 10^9$ cfu/mL,芽孢率达 98% 的条件下降温保压。

[0160] 4) 发酵液浓缩

[0161] 将步骤 3) 的发酵培养物在罐压 0.08-0.14Mpa 条件下,将管道灭菌 90-120 分钟,收集发酵液,并将发酵液进行浓缩至水的质量百分含量为 50%-60%,得到菌泥。向所述菌泥中加入质量百分含量为 5% 的麦芽糊精。

[0162] 5) 低温真空干燥将步骤 4) 所收集的菌泥在低温真空干燥箱内,温度 37℃,真空度 -0.096Mpa 的条件下过筛收集产品,得到地衣芽孢杆菌制剂。

[0163] 6) 活菌计数

[0164] 将步骤 5) 得到的地衣芽孢杆菌制剂进行活菌计数检测。实验设三次重复,结果取平均值。结果显示,利用该方法所得的地衣芽孢杆菌制剂中地衣芽孢杆菌的数量(以活菌数计)为 5×10^{10} cfu/g。

[0165] 7) 包装出厂:密封包装,常温,阴凉干燥处贮藏。

[0166] 方法二:

[0167] 发酵培养基配方:蔗糖 35g/L,豆粕 35g/L、NaCl 1g/L, K_2HPO_4 0.1g/L, $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1g/L, $MnSO_4 \cdot 0.1g/L$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L,加水充分溶解,pH6.0-6.4。所述浓度均为各物质在培养基中的终浓度。

[0168] 整个地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 发酵生产流程具体如下:

[0169] 1) 发酵空罐灭菌:与方法一相同。

[0170] 2) 发酵实罐灭菌:与方法一相同。

[0171] 3) 发酵培养:与方法一基本相同,不同的是发酵温度为 15℃,发酵时间为 10 小时。

[0172] 4) 发酵液浓缩:与方法一基本相同。

[0173] 5) 低温真空干燥:与方法一基本相同。

[0174] 6) 活菌计数:与方法一基本相同,不同的是结果显示,利用该方法所得的地衣芽孢杆菌制剂中地衣芽孢杆菌的数量(以活菌数计)为 3×10^{10} cfu/g。

[0175] 7) 包装出厂:密封包装,常温,阴凉干燥处贮藏。

[0176] 方法三:

[0177] 发酵培养基配方:蔗糖 45g/L,豆粕 45g/L、NaCl 5g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g/L, $MnSO_4 \cdot 0.5g/L$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L,加水充分溶解,pH6.0-6.4。所述浓度均为各物质在培养基中的终浓度。

[0178] 整个地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 发酵生产流程具体如下:

[0179] 1) 发酵空罐灭菌:与方法一相同。

[0180] 2) 发酵实罐灭菌:与方法一相同。

[0181] 3) 发酵培养 : 与方法一基本相同, 不同的是发酵温度为 45℃, 发酵时间为 18 小时。

[0182] 4) 发酵液浓缩 : 与方法一基本相同。

[0183] 5) 低温真空干燥 : 与方法一基本相同。

[0184] 6) 活菌计数 : 与方法一基本相同, 不同的是结果显示, 利用该方法所得的地衣芽孢杆菌制剂中地衣芽孢杆菌的数量(以活菌数计) 为 8×10^{10} cfu/g。

[0185] 7) 包装出厂 : 密封包装, 常温, 阴凉干燥处贮藏。

[0186] 实验例 5、地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 制剂的应用

[0187] 本实施例将以仔猪和肉鸡分别作为试验动物, 检测地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 及其制剂在作为动物饲料添加剂中的应用。

[0188] 一、地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 制剂对仔猪生产性能的影响

[0189] 1、试验材料

[0190] 试验动物 : 选取 28 ± 2 d 断奶的杜长大三元杂种仔猪 180 头。

[0191] 地衣芽孢杆菌制剂 : 按照实施例 4 步骤二中方法制备的地衣芽孢杆菌制剂 (8×10^{10} cfu/g)。在本实施例中, 该地衣芽孢杆菌制剂作为动物饲料添加剂使用。同时, 该地衣芽孢杆菌制剂还可以作为抑菌产品使用。

[0192] 2、试验分组

[0193] 将 180 头杜长大三元杂种仔猪按体重随机区组分为 2 个处理组, 每组 6 个重复, 每个重复 15 头仔猪。处理 1 为试验组, 基础日粮添加 100g/t 的地衣芽孢杆菌制剂 ; 处理 2 为对照组(仅有基础日粮)。基础日粮的组成及营养成分见表 7。

[0194] 表 7 生长试验的基础日粮组成和营养水平

	饲料原料	质量含量 (%)	营养水平 ¹	
	玉米	58.75	消化能 (Mcal/kg)	3.29
	豆粕	20.00	粗蛋白 (%)	18.10
[0195]	鱼粉	5.50	钙 (%)	0.77
	麦麸	5.00	总磷 (%)	0.53
	乳清粉	5.00	赖氨酸 (%)	1.34
	豆油	2.00	蛋氨酸 (%)	0.66

	磷酸氢钙	1.30	蛋氨酸+胱氨酸 (%)	0.89
	预混料 ²	1.00	苏氨酸 (%)	0.78
	石粉	0.40		
[0196]	食盐	0.30		
	蛋氨酸	0.30		
	赖氨酸	0.45		
	合计	100.00		

[0197] 注:1 中的粗蛋白、赖氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、苏氨酸、钙和磷为实测值;2:每公斤预混料提供维生素 A 11000IU;维生素 D₃ 1503IU;维生素 E 44.1IU;维生素 K4.0mg;核黄素 5.22mg;泛酸 20.0mg;烟酸 26.0mg;维生素 B₁₂0.01mg;锰 35.0mg;铁 100.0mg;锌 90.0mg;铜 16.5mg;碘 0.30mg;硒 0.30mg。

[0198] 3、饲养管理

[0199] 试验于郑州市三泰饲料有限公司养猪场进行。试验期 45 天。试验期间仔猪饲养在全封闭式的保育仔猪舍内,舍内的温度保持在 24 ~ 27℃。自由采食,每个栏圈安装有鸭嘴式饮水器供仔猪自由饮水。基础日粮中的预混料自配,不含有任何抗生素。仔猪的免疫按猪常规兽医传染病的免疫程序进行,仔猪饲养管理措施严格执行卫生防疫制度。

[0200] 4、检测指标和方法

[0201] (1) 各处理组对仔猪断奶后生长性能的影响:试验在开始时以及结束时称仔猪个体重,计算每个处理组的个体平均日增重和日采食量,同时计算料肉比。所述料肉比为平均日采食量与平均日增重的比值。(2) 各处理组对断奶仔猪腹泻的影响:在整个饲养试验阶段,每天上午 9:00 点观察猪粪便情况(每头腹泻猪当天只统计一次)。

[0202] (3) 各处理组对断奶仔猪皮毛指数的影响:试验结束时对仔猪的外观(即皮毛指数,包括皮肤红润程度、毛色亮度和毛顺程度三方面)进行逐头评分,具体评分标准见表 8。

[0203] 表 8 仔猪外观评分标准

[0204]

分数	皮肤红润程度	毛色亮度	毛顺程度
1	苍白	无光泽	明显凌乱
2	微红	微弱光泽	微弱凌乱
3	红润	明显光泽	柔软

[0205] 注:每头仔猪的外观即皮毛指数得分为该头仔猪的皮肤红润程度得分 + 毛色亮度得分 + 毛顺程度得分。

[0206] 5、数据统计:试验所有数据采用 SPSS12.0 (SPSS Inc., USA)统计软件的独立样本 t 检验处理统计。

[0207] 6、试验结果

[0208] (1) 地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 及其制剂对仔猪断奶后生长性能的影响

[0209] 试验结果如表 9 所示,与对照组(仅有基础日粮)相比,试验组(基础日粮添加 100g/t 的地衣芽孢杆菌制剂)显著提高了断奶仔猪的日增重、采食量,同时降低了料肉比($P < 0.05$)。

[0210] 表 9 基础日粮中添加地衣芽孢杆菌及其制剂对断奶仔猪生产性能的影响

	处理组	平均日采食量 (kg)	平均日增重 (kg)	料肉比
[0211]	试验组	0.363 ^a	0.284 ^a	1.278 ^b
	对照组	0.347 ^b	0.25 ^b	1.388 ^c

[0212] 注:不同小写字母表示两者之间差异显著。

[0213] (2) 地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 及其制剂对断奶仔猪腹泻的影响

[0214] 试验结果如表 10 所示,与对照组(仅有基础日粮)相比,试验组(基础日粮添加 100g/t 的地衣芽孢杆菌制剂)显著降低了断奶仔猪的腹泻率($P < 0.05$)。

[0215] 表 10 各组仔猪腹泻率统计

[0216]

处理组	对照组	试验组
腹泻率 (%)	2.7	1.3

[0217] 注:所述腹泻率为发生腹泻的猪数量占总数量的百分含量。

[0218] (3) 地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) C30-2CGMCC No. 5350 及其制剂对断奶仔猪皮毛指数的影响

[0219] 试验结果如表 11 所示,与对照组(仅有基础日粮)相比,试验组(基础日粮添加 100g/t 的地衣芽孢杆菌制剂)的皮毛指数显著提高($P < 0.05$)。

[0220] 表 11 日粮中添加地衣芽孢杆菌制剂对仔猪皮毛指数的影响

项目	对照组	试验组	标准误	
[0221]	皮毛指数	5.7 ± 0.09 ^b	6.6 ± 0.08 ^a	0.04

[0222] 以上试验结果表明,在规模化养殖过程中,在基础日粮中添加地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 及其制剂能提高断奶仔猪的生长性能、降低腹泻率,同时改善猪只皮毛,从而增加猪的经济效益。

[0223] 二、地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*)C30-2CGMCC No. 5350 制剂对肉鸡生长性能的影响

[0224] 1、试验材料

[0225] 试验动物:同一天出生的健康白羽肉鸡雏白羽肉鸡(市面上常售品种)6.5 万羽。

[0226] 地衣芽孢杆菌制剂:按照实施例 4 步骤二中方法制备的地衣芽孢杆菌制剂

8×10^{10} cfu/g。在本实施例中,该地衣芽孢杆菌制剂作为动物饲料添加剂使用。同时,该地衣芽孢杆菌制剂还可以作为抑菌产品使用。

[0227] 2、试验分组

[0228] 将 6.5 万羽白羽肉鸡雏随机平均分配到 6 栋鸡舍(即本试验 6 个重复)中,其中每栋鸡舍平分两组:处理组(基础日粮中添加地衣芽孢杆菌制剂)和对照组(仅有基础日粮)。基础日粮的组成及营养成分见表 7 处理组中地衣芽孢杆菌制剂的添加量分别为:试验前期(1~15d)为 120mg/kg(芽孢杆菌制剂 mg/基础日粮 kg,下同);试验中期和后期(15~30d)均为 100mg/kg;试验后期(30~43d)为 0mg/kg。各处理组的营养水平符合中国 2004 版“鸡饲养标准”。

[0229] 3、饲养管理

[0230] 试验在山东中慧饲料有限公司试验鸡场进行。整个试验期为 43d,分为 3 个阶段:1~15d(试验前期);15~30d(试验中期);30~43d(试验后期)。试验期间采用全封闭式饲养管理,每栋鸡舍由专人负责。肉鸡采用地面垫料平养,稻壳做垫料。喂给干粉料,自由采食和饮水。每周消毒二次,消毒方式为喷雾消毒。温度由温度调控器控制,加热方式采用鼓风机吹热风。通风采用排风扇纵向拉风,两侧有进风口。光照用白炽灯。按照正常免疫程度免疫(第 7d 采用滴鼻点眼免疫的方式免疫新城疫疫苗 IBH120,第 14d 采用滴鼻点眼免疫的方式免疫法氏囊疫苗,21d 和 28d 均进行饮水免疫传支和新城疫弱毒苗二联苗及传染性法氏囊疫苗。每日观察鸡群健康情况与精神状况。整个试验按照肉仔鸡正常的饲喂管理程序进行。

[0231] 4、检测指标和方法

[0232] 试验结束,肉鸡出场称重,记录其重量与耗料量,计算每组的个体平均日采食量、日增重和料重比。另外,统计各组肉鸡的存活率及计算每组的个体平均毛利润。

[0233] 路耗(进雏时从孵化厂到肉鸡厂的运输过程中死亡的鸡数)

[0234] 存活率 = $\{ [65000 + 200 (\text{路耗})] - \text{死亡鸡数} \} / 65000 * 100\%$

[0235] 日增重 = 总重量 / 65000 / 日龄

[0236] 日采食量 = 总耗料量 / 日龄 / 65000 / 料肉比 = 日采食量 / 日增重

[0237] 毛利润 = $\{ [8.8 \text{ ¥} (\text{每千克鸡肉售价}) * \text{总重量}] - \text{总耗料价钱} \} / 65000$

[0238] 5、数据处理

[0239] 数据处理采用 SAS 8.2 统计软件中方差分析和 Duncan's 多重比较法进行数据分析。结果用均值及平均标准误表示,差异显著性用 $P < 0.05$ 表示。

[0240] 6、试验结果

[0241] 基础日粮中添加地衣芽孢杆菌制剂能够显著提高肉仔鸡的日增重,平均单只重,降低日采食量和料肉比($P < 0.05$),增加每只鸡的毛利润(表 12),具有可观的经济效益。

[0242] (1) 地衣芽孢杆菌制剂对肉仔鸡生长性能的影响

[0243] 试验结果如表 12 所示,与对照组(仅有基础日粮)相比,处理组(基础日粮添加地衣芽孢杆菌制剂)使每栋鸡舍的平均日增重提高 0.62g、平均日采食量降低 0.09g、料肉比下降 0.09%、肉仔鸡单只重提高 0.04g,且差异显著。这表明地衣芽孢杆菌制剂能够提高肉仔鸡的生长速度,降低采食量和料肉比,从而提高整群鸡的经济效益。

[0244] 与对照组(仅有基础日粮)相比,处理组(基础日粮添加地衣芽孢杆菌制剂)使整个

鸡群的存活率提高 1.92%，整个鸡群的弱雏数、肉仔鸡的死亡率在一定程度上都下降，且整个鸡群的健康状态相比于对照组要好。

[0245] (2) 基础日粮中添加地衣芽孢杆菌制剂的经济效益分析

[0246] 试验结果如表 12 所示，与对照组（仅有基础日粮）相比，处理组（基础日粮添加地衣芽孢杆菌制剂）能够提高每只鸡的毛利润，平均每只鸡提高 0.92 元，整个鸡群的毛利润相对于对照组提高 2.99 万元，具有非常可观的经济效益。

[0247] 表 12 地衣芽孢杆菌制剂对肉仔鸡生长性能的影响

项目	日粮		标准误	P 值
	对照组	处理组		
日增重 (g/栋)	46.07	46.69	0.49	0.0013
日采食量 (g/栋)	94.53	94.44	0.22	0.0126
料肉比 (%)	2.12	2.03	0.23	0.0121
存活率 (%)	95.12	96.04	0.61	0.0014
单只重 (kg)	1.91	1.95	0.17	0.0212
毛利润 (元)	2.35	3.27	0.37	<0.0001

[0249] 以上试验结果表明，在规模化养殖过程中，在基础日粮中添加本发明的地衣芽孢杆菌制剂能够显著提高肉仔鸡的日增重，平均单只重，降低日采食量和料肉比 ($P < 0.05$)，增加每只鸡的毛利润，具有可观的经济效益。

[0001]

<110> 北京龙科方舟生物工程技术有限公司

<120> 一株地衣芽孢杆菌及其应用

<130> CGGNARK123011

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1490

<212> DNA

<213> 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)

<400> 1

gctatacatg cagtegagcg gacagatggg agcttgctcc ctgatgtag cggeggacgg	60
gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta	120
ataccggatg cttgattgaa ccgcatgggt caattataaa aggtggcttt tagctaccac	180
ttacagatgg accceggcg cattagetag ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg	240
ttacagatgg accceggcg cattagetag ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg	300
atgcgtagcc aacctgagag ggtgatcgge cacactggga ctgaaacacg gccc aaactc	360
ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgce	420
gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttagggaaaa acaagtaccg	480
ttcgaatagg geggtacctt gacggfacct aaccaaaaag ccacggctaa ctacgtgcca	540
ccagecggcg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcg taaagcgcgc	600
gcaggeggtt tettaaget gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggteattgga	660

[0002]

aactggggaa cttgattgca gaaaaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg	720
tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag	780
gcgcgaaagc gtgggggagc gaacaggatt agatacctg gtagtccaag ccgtaaacga	840
tgagtgetaa gtgttagagg gtttccgcc tttagtgtg cagcaaacgc attaagcaact	900
cegectgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaaa	960
gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc	1020
ctctgacaac cctagagatg gggcttcccc ttcgggggca gactgacagg tggatgatgg	1080
ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg gtttaagtccc gcaacgagcg caacccttga	1140
tcttagttgc cagcattcag ttgggcaact taaggtgact gccggtgaca aaccggagga	1200
aggtggggat gacgtcaaat catcatgecc cttatgacct gggctacaca cgtgetacat	1260
gggcagaaca aagggcagcg aagccgcgag gctaagccaa tcccacaaat ctgttctcag	1320
ttcggategc agtetgcaac tcgactgegt gaagctggaa tegctagtaa tcgcgatca	1380
gcatgccgcg gtgaatacgt tcccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt	1440
ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct tttggagcca gccgccgaag	1490

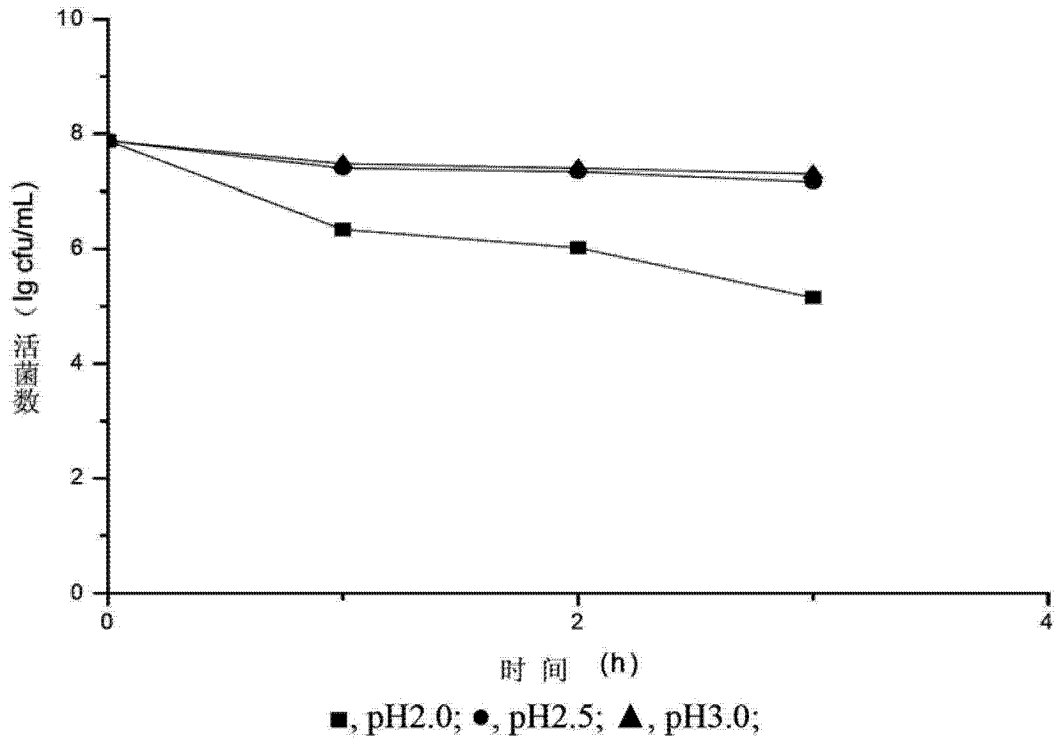


图 1

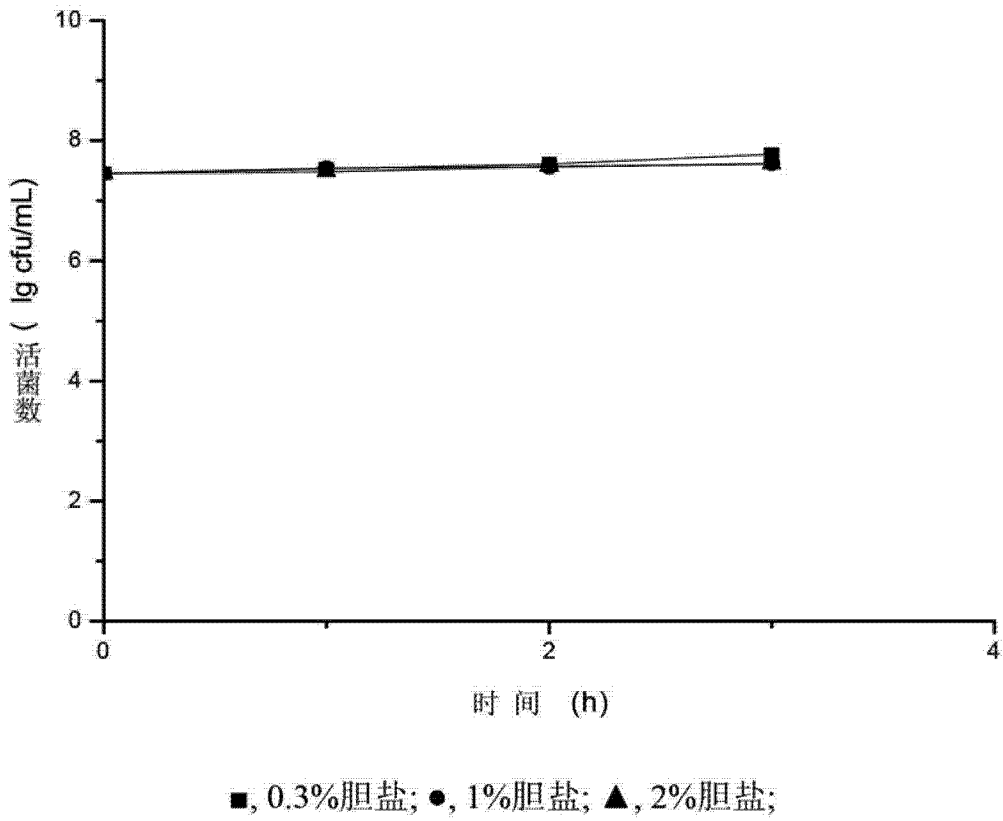


图 2

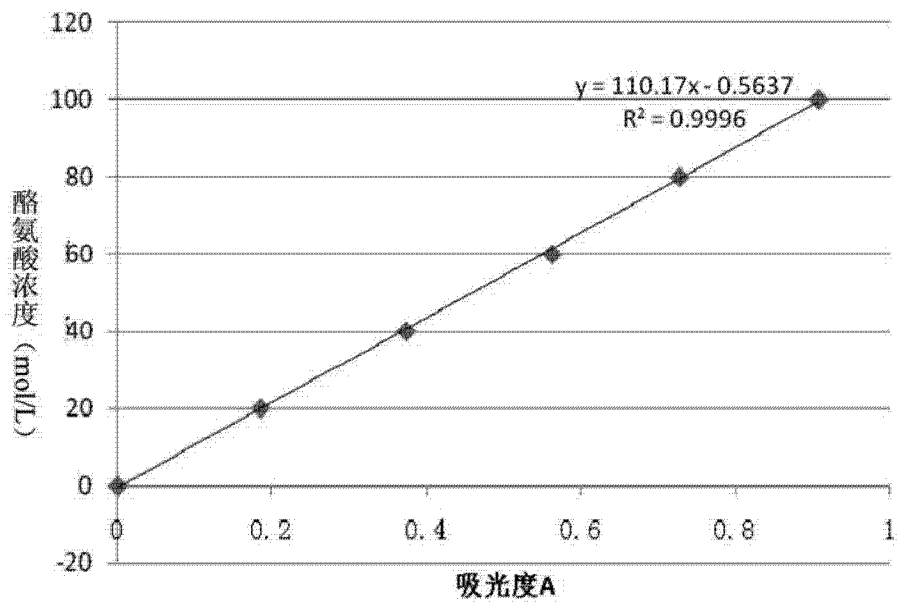


图 3

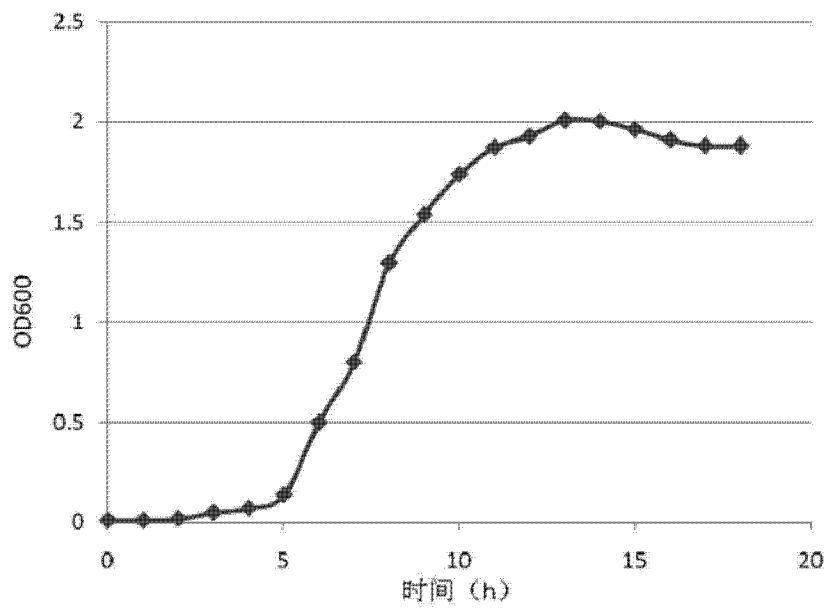


图 4