[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 36/064 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018329.9

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101448510A

[22] 申请日 2007.5.16
[21] 申请号 200780018329.9
[30] 优先权
[32] 2006. 5.19 [33] FR [31] 0604527
[86] 国际申请 PCT/FR2007/000835 2007.5.16
[87] 国际公布 WO2007/135278 法 2007.11.29
[85] 进入国家阶段日期 2008.11.19
[71] 申请人 乐斯福公司
地址 法国巴黎
[72] 发明人 塞西勒·桑普索尼斯
埃里克·奥克莱尔
[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司
代理人 徐金国
权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

有益微生物组合物、含有该组合物的颗粒、及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明涉及一种益生菌组合物或预混合物，该组合物或混合物包括活体或再生有益微生物、酵母壁、和/或失活酵母、和可选的营养补充物，该营养补充物尤其包含的维生素和/或微量元素和/或氨基酸和/或其它适宜动物营养物。 本发明还涉及一种包含所述组合物和适宜动物营养物的颗粒，以及该颗粒的制备方法。

1. 一种益生菌组合物或预混合物，包括：

- 活体或再生有益微生物（a）0.5-75%，选自益生酵母、含乳酸菌类型的有益菌，及其混合物；所述乳酸菌选自乳酸杆菌和除芽孢杆菌以外的双歧杆菌；

- 化合物（b）10-95%，选自酵母壁和失活酵母；和

- 营养补充剂（C）0-95%，特别包括维生素、和/或微量元素、和/或氨基酸、和/或其它可用于动物饲料中的添加剂；

百分数以干重比组合物的总重量表示。

2. 根据权利要求 1 所述的益生菌组合物，优选包括：

- 活体或再生微生物 5-30%；

- 酵母壁和/或失活酵母 15-80%，更优选 25-75%；

- 营养补充剂 5-80%；

上述百分比是以干重比组合物的总重量来表示的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其特征在于，所述益生酵母选自酵母属酵母，优选酿酒酵母，或克鲁维酵母属酵母，优选马克斯克鲁维酵母，及其混合物。

4. 根据权利要求 3 所述的组合物，其特征在于，对应于菌株的酵母选自：保藏在国立酵母菌保藏中心（NCYC）的编号 47 的酿酒酵母 Sc47 菌株，保藏在巴斯德保藏中心（CNCM）的编号 I-1007 的酿酒酵母株，保藏在巴斯德保藏中心（CNCM）的编号 I-1009 的酿酒酵母株，保藏在 MUCL 保藏中心的编号 39 885 的酿酒酵母株，保藏在 CBS 保藏中心的编号 39 493.94 的酿酒酵母株，保藏在 MUCL 保藏中心的编号 39434 的马克斯克鲁维酵母，及其混合物。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的益生菌组合物，包括：

- 活体或再生酵母 0.5-75%，优选 5-30%；

- 酵母壁和/或失活酵母 10-80%，优选 25-50%；

- 营养补充剂 0-95%，优选 5-80%；

上述百分比是以干重比组合物的总重量来表示的。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的组合物，其特征在于，所述酵母壁和/或失活酵母选自酵母属。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中根据试验 A 测得有益微生物的干物质含量的变化是正数的；根据试验 A，在时间 T_0，即有益微生物和酵母壁和/或失活酵母混合之前，利用 ISO 1741 方法测定有益微生物的干物质含量，得到值 DM_0；在时间 T=14 天，即有益微生物和酵母壁和/或失活酵母混合 14 天后，测定有益微生物的干物质含量，得到值 DM_T；然后进行计算：$V=[(DM_T - DM_0)/DM_0] \times 100$。

8. 一种益生菌颗粒，包括：

- 权利要求 1-7 任一项所述的益生菌组合物或预混合物；
- 适于欲给予的动物饲料中的营养混合物。

9. 根据权利要求 8 所述的颗粒，其中有益微生物的存活率 S 大于或等于 20%，优选大于或等于 50%，更有选大于或等于 70%。

10. 一种制备颗粒的方法，包括下述步骤：

- 制备权利要求 1-7 任一项所述的益生菌组合物或预混合物；
- 将该益生菌组合物或预混合物加到适于欲给予的动物饲料的营养混合物中，优选潜伏期至少 14 天以后；
- 在温度 60-100℃，压力 0.5-3.5bar 下将蒸汽注入上述步骤得到的混合物中并加压。

11. 一种提高益生菌颗粒稳定性的方法，包括：制备权利要求 1-7 任一项所述的益生菌组合物，所述组合物包括有益微生物和酵母壁和/或失活酵母，和可选择的营养补充剂，所述营养补充剂尤其包括维生素、和/或微量元素、和/或氨基酸、和/或其它动物饲料附加剂，在蒸汽注入形成颗粒步骤之前将所述组合物加到欲给予的动物种类的营养混合物中并加压。

12. 根据权利要求 1-7 任一项所述的益生菌组合物和预混合物作为动物饲料的应用。

13. 根据权利要求 8 或 9 的颗粒或权利要求 10 的方法制备的颗粒作为动物饲料的应用。

有益微生物组合物、含有该组合物的颗粒、及其制备方法与应用

技术领域

本发明的主题是一种包含活体或再生的有益微生物的益生菌组合物或预混合物，其包含活体或再生有益微生物、酵母壁和/或失活酵母。酵母壁和/或失活酵母的存在特别用于稳定该有益微生物。这种组合物或预混合物可以用于制备作为动物饲料的颗粒。

背景技术

术语“益生菌”（或有益微生物）指活体微生物，当它们被足量摄取后，通过增强肠内菌丛的特性对宿主有机体发挥积极作用，远超过传统的营养作用。它们成为动物饲料中使用的抗生素的替换物。目前最常见的是食品或食品补充剂中的细菌或酵母。

益生菌主要分为四种类型：

- 乳酸菌（乳酸杆菌和球菌）；
- 来源于人和动物体的双歧杆菌；
- 各种酵母，包括酵母属（*Saccharomyces*）型酵母；
- 其他产芽孢杆菌，包括枯草芽孢杆菌和蜡样芽胞杆菌。

可加热杀灭的微生物不符合上述益生菌的定义，即使一些治疗作用可能归因于它们。

广义上讲，术语“益生菌”也指含有上述微生物的食品。

益生菌逐渐地被用于人类消费和作为动物饲料，尤其作为抗生素替代物成为一种更健康、更自然和更环保的食物。在动物营养学中，这些微生物通常以预混合物的形式添加到颗粒饲料中，该预混合物还包含维生素、微量元素和氨基酸。

然而将有益微生物引入颗粒中并非易事，实际上，有益微生物在形成颗粒的过程中经常被灭活。颗粒生产中这一步是在蒸汽温度 60℃到 100℃之

间，压力 0.5 到 3.5bar 范围内进行的，而在这种温度和湿度条件下，微生物通常都被灭活。

专利申请 EP 0 694 610 中，红发夫酵母（*Phaffia rhodozyma*）可以制造染料、虾青素以及用于使饲养鳟鱼和鲑鱼的鱼饲料显示红色。通过在糖（例如葡萄糖）存在下进行干燥已经使红发夫酵母难以制成颗粒的情况有所改善。

然而，这种情况并不包括动物消化过程中为发挥其作用必须保持活性的益生酵母。

出人意料地，本发明人发现，有益微生物与酵母壁和/或失活酵母进行混合，取代其它传统使用的预混合物载体例如小麦粉或碳酸钙，随时间过去，有益微生物显示其在预混合物中稳定性增强。

酵母壁在药理学和农业-食品部门的应用已有描述。这些酵母壁在药用片剂的制备中用作赋形剂，尤其是其具有崩解的性质用作粘合剂（Ozeki et al. AAPS PharmSciTech, 2003;4(3):E41）或者作为包衣制品的组分（EP 1 159 882, Yuasa et al. Int J. Pharm., 2002, Apr 26;237(1-2): 15-22）。然而针对申请人公司的知识，用它们来增强活体或再生微生物稳定性的可能性至今没有人意识到。

因此，对于微生物来说，随着时间过去能保持稳定是现实需要，对摄取它们的动物健康的预期影响也是现实的。

发明内容

为此，本发明的主题是提供一种益生菌组合物或预混合物，包括：

- 活体或再生益生菌微生物（a）0.5-7%，选自益生酵母、含乳酸菌类型的有益菌；及其混合物，所述乳酸菌选自乳酸杆菌和除芽孢杆菌（*bacilli*）以外的双歧杆菌。
- 化合物（b）10-95%,选自酵母壁和失活酵母，和
- 营养补充剂（C）0-95%，尤其包括维生素、和/或微量元素、和/或氨基酸、和/或其它可用于动物饲料中的添加剂。

上述百分比是以干重比组合物的总重量来表示的。

在本发明中，表述“再生”或“能成活的”微生物应理解为表示一类微生物，它们可在营养介质存在下，可恢复其分裂和形成群体的能力。

由益生酵母的例子，可提到选自下述组的益生酵母，包括酵母属（*Saccharomyces*）酵母，克鲁维酵母属（*Kluyveromyces*）酵母例如马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*），及其混合物。

优选的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）菌株实施例为：保藏在（英国）国立酵母菌培养保藏中心（NCYC）的酿酒酵母 Sc47 菌株，编号 47；保藏在巴斯德保藏中心（CNCM）的酿酒酵母菌株，编号 I-1007；保藏在巴斯德保藏中心（CNCM）酿酒酵母菌株，编号 I-1009；保藏在 MUCL 保藏中心的酿酒酵母菌株，编号 39 885；保藏在 CBS 保藏中心的酿酒酵母菌株，编号 39 493.94；保藏在 MUCL 保藏中心的马克斯克鲁维酵母，编号 39434；及其混合物。

最优选地，根据本发明的组合物包括的酵母，其对应保藏在国立酵母菌培养保藏中心（NCYC），编号为 47 的酿酒酵母 Sc47 菌株。

因此，根据一最具体实施例，所述益生菌组合物或预混合物包括：

- 活体或再生酵母 0.5-75%，优选 5-30%；
- 酵母壁和/或失活酵母 10-80%，优选 25-50%；
- 营养补充剂 0-90%，优选 5-80%；

上述百分比是以干重比组合物的总重量来表示的。

该组合物作为单胃动物饲料特别稳定。

所述酵母壁，可以选自各种食品等级的酵母，例如酿酒酵母。更具体地说，酵母壁为市售的商标为 PRONARDY®，SAFMANNAN®或者 BIOMOS® 的酵母，分别来自 Prodessa，Biospringer 和 Alltech 公司。

所述酵母壁可以根据本领域技术人员知悉的方法获得，更具体地说，酵母壁自溶后，用物理方法将不溶部分与溶解部分分离，其中不溶部分含有酵母壁。

在本发明上下文中，失活酵母理解为没有任何发酵能力的酵母。只要属于食品等级，任何类型的失活酵母都可使用，例如酵母（*Saccharomyces*）。它们可以根据本领域技术人员知悉的方法获得，更具体地，通过加热处理得到。

根据本发明的最优实施例，失活酵母干物质含量高于 95%。

当使用失活酵母和酵母壁混合物时，酵母的来源可以相同或不同。

本发明的益生菌组合物具有令人非常满意的均匀性。

不希望被任何理论所束缚，根据本发明所述的组合物或预混合物中的酵母壁和/或失活酵母，通过减少有益微生物的水含量并使水含量随时间保持稳定，使得有益微生物保持稳定性成为可能。另一方面，当使用现有技术中记述的尤其是包括面粉和碳酸钙的传统预混合物载体时，水含量大大增加。而且使用碳酸钙会引起磨损和分离的问题。

因此，根据一种具体的实施方式，根据下述试验 A 测定的有益微生物中的干物质含量的变化值 V_A 是正的。

试验 A：

在时间 T_0，即有益微生物和酵母壁和/或失活酵母混合之前，利用 ISO 1741 方法测定有益微生物的干物质含量，得到值 DM_0。

在时间 T=14 天，即有益微生物和酵母壁和/或失活酵母混合 14 天后，测定有益微生物的干物质含量，得到值 DM_T。

然后进行计算：$V=[(DM_T - DM_0)/DM_0] \times 100$。

优选地，有益微生物的干物质含量变化值 V 大于 0.5%，优选大于 1%。

根据一种具体的实施方式，本发明所述的组合物或预混合物还可以包括营养补充剂，特别包括维生素和/或微量元素和/或氨基酸和/或其它可用于动物饲料的添加剂。

组合物中加入的维生素选自维生素 A、维生素 B、维生素 D3、维生素 E、维生素 B1、B2、B5、B6、B12、C、PP、维生素 H、叶酸、胆碱、维生素 K3、泛酸，及其混合物。

组合物中加入的微量元素可以是食品等级的矿物盐，选自铜、锌、铁、锰、碘、硒，及其混合物。

组合物中加入的氨基酸选自蛋氨酸、赖氨酸、L-苏氨酸、色氨酸，及其混合物。

上述益生菌组合物或预混合物可以直接加入动物饲料中。一般来说，根据本发明的组合物，总重每千克动物饲料中加入 5×10^7 到 5×10^{10}CFU（菌落形成单位）有益微生物，优选总重每千克动物饲料中加入 5×10^8 到 5×10^{10}CFU 有益微生物。

例如，本发明所述组合物的有益微生物是 Lesaffre 公司提供的商标为 BIOSAF®的酿酒酵母 Sc47 时，加入到动物饲料中的本发明组合物，每一千克动物饲料总量中含有酿酒酵母 Sc472.5 到 8×10^9 CFU。

上述益生菌组合物也可用于益生菌颗粒，尤其适用于动物饲料。

因此，根据另一项实施方式，本发明涉及的益生菌颗粒包括：

- 上述益生菌组合物或者预混合物，和
- 一种适用于欲给予的动物种类的营养混合物。

一般来说，本发明所述的颗粒包含质量分数为千分之一的有益微生物。

所述营养混合物是一种由制备用于动物物种颗粒的本领域的技术人员常规使用的混合物，其组成取决于欲给予的动物种类，但是通常含有植物纤维粉，例如小麦粉或/和大豆油或油菜籽油渣饼和/或甜菜浆和/或糖浆和/或尿素，以本领域技术人员所熟知的比例配制。然后预混合物掺到原料（饲料）中，原料种类及量取决于动物物种。

该营养混合物选自富含维生素和/或微量元素和/或氨基酸和/其它可用于动物饲料的添加剂。与本发明益生菌组合物相关的动物饲料如下所述。

制备本发明所述颗粒的方法，包括下述步骤：

- 制备根据本发明的益生菌组合物或预混合物；
- 将所述的组合物或预混合物加入到适于欲给予的动物种类的营养混合物中，优选在潜伏期至少 14 天之后；
- 在温度 60°C-100°C，压力介于 0.5-3.5 bar 条件下将蒸汽注入事先得到的混合物，并冲压。

有利的，包含有益微生物的组合物或预混合物在加入到营养物混合物之前可以存活至少 15 天，优选至少 1 个月。

根据本发明的方法获得的颗粒具有令人非常满意的有益微生物存活率。

根据一种具体实施方式，有益微生物形成颗粒过程中的存活率可以通过系数 S 来测定，系数 S 相当于制粒后 CFU 值（CFU_{af}）与制粒前 CFU 值（CFU_{be}）的比例乘以 100。根据本发明的颗粒中微生物的存活率大于或等于 20%，优选大于或等于 50%，更有选大于或等于 70%。

本发明还涉及一种改善含益生菌组合物或者预混合物的益生菌颗粒的稳定性的方法。所述组合物或预混合物包括有益微生物和酵母壁和/或失活酵

母，还可选择包括营养补充物，该补充物尤其含有适合于动物的维生素和/或微量元素和/或氨基酸和/其他添加剂。在蒸汽注入形成颗粒以及冲压之前，将该组合物加入到营养混合物中。

如上所述，可发现对制粒温度的耐受性尤其是由于根据本发明的组合物中存在的有益微生物的干物质含量增加或保持。

本发明所述的颗粒，或者通过本发明方法所获得的颗粒，可被用作动物饲料。

本发明提供一种供应量可控的有益微生物，其最终饲料中活体有益微生物的含量占根据本发明的组合物或颗粒的生产用量的至少 20%。

具体实施方式

本发明可以通过如下实施例以及图表更加准确的描述和说明，当然这些实施例仅用于解释本发明的主题，不以任何方式构成对本发明的限制。

实施例：

实施例 1：使用材料

本发明的实施例采用如下材料：

益生酵母是商标为 BIOSAF®的市售产品（其余实施例只用 BIOSAF®表示），BIOSAF®是酿酒酵母菌株 Sc47 活体细胞的浓缩物，1×10^{10} CFU/g（NCYC-47）。此产品仅限于动物饲料，以颗粒形式提供，温度达 80°C 显示热稳定性。

酵母壁由酿酒酵母壁组成，自溶后通过离心分离制得。

失活酵母由酿酒酵母壁组成，通过热处理制得。物理性质如下表 1 所示：

	酵母壁	失活酵母	BIOSAF®
粒度	中值粒径=182.4μm 68% 的颗粒直径介于 80.6 和 412.8μm 之间	中值粒径=178.4μm 68% 的颗粒直径介于 103.9 和 306.4μm 之间	中值粒=1354.2μm 68%的颗粒直径介于 992.5 和 1847.8μm 之间
	酵母壁	**失活酵母**	**BIOSAF®**
表观密度 g/cm^3	0.452	0.629	0.797
水分%	3.5	4.5	7.0

实施例 2：

2.1 预混合物的制备

不同组成的混合物（预混合物 1-3）通过手工制备，组成如下表 2 所示：

材料	预混合物 1	预混合物 2	预混合物 3	预混合物 4
BIOSAF®	14%	14%	14%	14%
酵母壁	14%	86%	-	-
失活酵母	-	-	-	86%
小麦粉	-	-	14%	-
营养补充物	72%	-	72%	-

上述百分比是以预混合物总重量计算。

预混合物 3 为现有技术颗粒的组合物。

2.2 干物质含量的变化

预混合物 1-3 中 BIOSAF®的干物质含量通过官方 IOS1741 标准进行测定，测定时间 T 为 1 天，2 天，7 天和 14 天。结果如图 1 所示：

根据试验 A 的干物质变化按如下公式计算：

$V=[(DM_T - DM_0)/DM_0] \times 100$

预混合物/接触时间	1 天	2 天	7 天	14 天
预混合物 1	+0.1%	+0.5%	+0.6%	+0.7%
预混合物 2	+0.4%	+0.5%	+0.8%	+1.2%
预混合物 3	-0.9%	-0.9%	-1.0%	-1.2%

需要注意的是 BIOSAF®和预混合物的其他混合物接触的时间起到关键性作用，因为接触时间与被带入以达到均衡的产品的湿度相关。如果时间因素不利于 BIOSAF®-小麦粉混合物，在以酵母壁和/或失活酵母作为载体的情况下，接触时间最少为 14 天。

实施例 3：

以前的研究已经表明混合方法会损害 BIOSAF®产品，使其更容易吸潮。因此，有必要在工业条件下生产酵母壁-BIOSAF® 预混合物，以便确认所述酵母壁的积极作用。

3.1 按工业方法制备预混合物

BIOSAF 贮存于 5-6 米高的贮窖。生产过程中，通过直径为 10cm 的垂直气动传送带（浓相输送）将酵母运送到 50 米外的混合器中。空气入口（预先处理、干燥、冷却）通过连续通入空气和产品，可以推动产品通过传送带。

在传送带出口，有一称重筐在产品进入犁铧混合器前检测产品重量，混合物同时进入犁铧混合器。

混合器采用犁铧混合器，转速 120 圈/分钟，混合持续时间为 60 秒。最终的预混合物袋装或散装打包。

工业制备预混合物的组成如下表所示：

材料	预混合物 1a	预混合物 3a	预混合物 5
BIOSAF®	14%	14%	56%
酵母壁	14%	-	44%
失活酵母	-	-	-
小麦粉	-	14%	-
营养补充剂	72%	72%	-

3.2 干物质含量变化

BIOSAF®干物质含量变化与这些不同预混合物的时间有关，测定结果如实施例 2 所示。

同样地因为预混合物由手工制备，含有小麦粉的预混合物中 BIOSAF®的干物质含量有所下降，从 93%降低至 91.7%。

根据本发明的预混合物中干物质含量在预混合物 1a 中保持稳定（含 14%酵母壁），但在预混合物 5 中，接触时间一个月后干物质含量增加 0.3%（酵母壁含量 44%）。

当混合物在工业条件下制备时，酵母壁对于 BIOSAF®水分的影响更加不明显，然而通过对常规预混合物载体（例如，基于小麦）的观察，BIOSAF®的干物质含量没有下降。

实施例 4:

4.1 颗粒的制备

制粒试验使用一个固定的平底盘形模具（印有 KAHL.14-175 of 3 kW,直径 4mm，厚度 20mm (即压缩率为 5)，以实验室程序进行。打包机（国家农业科学研究院（INRA），法国南特）长 544mm，有 32 个旋转叶片，有一个 3.75 l 的容积。发动机 2.2kw 由调速器控制，可控制输出。温度设置在打包机的水平（80 和 90°C）。

在上述条件下制备两批颗粒。其中第一批颗粒在注入蒸汽温度 80°C 制备，第二批在注入蒸汽温度 90°C 制备。

制备好后，预混合物立即使用。

颗粒组合物的组成如下：

	颗粒 1	颗粒 2
小麦粉	29.3%	29.3%
大豆油渣饼	25%	25%
油菜籽油渣饼	20%	20%
甜菜浆	20%	20%
糖浆	3%	3%
尿素	2%	2%
预混合物 3a	0.7%	-
预混合物 5	-	0.7%

4.2 颗粒的耐受性研究

针对每一批次颗粒，测量 BIOSAF®存活率。结果如下所示：

颗粒	80°C	90°C
颗粒 1	9.4%	2.6%
颗粒 2	23.9%	5.4%

计算方法：

%耐受性或存活率＝颗粒中再生细胞量(CFU/g) X 100/制成颗粒前颗粒组合物再生细胞量(CFU/g)

结果显示存活率低，证明本发明所提供的加入到预混合物 3a 中的 BIOSAF®，与加入到预混合物 5 中的 BIOSAF®相比，制粒的耐受性非常低。

实施例 5：

与实施例 4 的同样的方法，以预混合物 3a 和 5 制备颗粒，其组成见实施例 3。不同的是，制粒是在预混合物制备一个月后进行。

	颗粒 1	颗粒 3
小麦粉	29.3%	29.3%
大豆油渣饼	25%	25%
油菜籽油渣饼	20%	20%
甜菜浆	20%	20%
糖浆	3%	3%
尿素	2%	2%
预混合物 3a	0.7%	-
预混合物 5	-	0.7%

4.2 制粒耐受性研究

针对每一批次颗粒，测量 BIOSAF®存活率来评估制粒耐受性。结果如下所示：

颗粒	80°C
颗粒 1	4.6%
颗粒 2	27.9%

显而易见，根据本发明研制的颗粒对制粒具有耐受性，因此，存活率比对照组高 6 倍。