



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103820363 B

(45) 授权公告日 2016.02.24

(21) 申请号 201410039346.2

CN 102747003 A, 2012.10.24,

(22) 申请日 2014.01.27

CN 103211105 A, 2013.07.24,

(83) 生物保藏信息

WO 2009110940 A2, 2009.09.11,

CGMCC No. 8296 2013.10.09

刘勇. 尿肠球菌致病性增强机制的研究.《中国优秀硕士学位论文数据库》.2011, 全文.

(73) 专利权人 福建省农业科学院生物技术研究
所

审查员 张全红

地址 350003 福建省福州市五四路 247 号

(72) 发明人 宋铁英 陈曦 李素一 林晨韬
陈叙

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A23K 10/18(2016.01)

C12R 1/46(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102742728 A, 2012.10.24,

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种尿肠球菌菌粉的制备与应用

(57) 摘要

本发明提供一种尿肠球菌菌粉的制备与应用,提供了一株筛选自猪场周边土壤的菌株,其分类命名属于肠球菌属、尿肠球菌种。经喷雾干燥制成菌粉,可作为猪饲料添加剂使用。其中尿肠球菌已于2013年10月22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,菌种保藏代号:CGMCC No. 8296,菌株代码BBH201305001。该菌粉的生产工艺简单,成本低,可调整猪肠道菌群,提高机体的免疫细胞水平,加固肠道屏障功能,加强机体对营养物质的消化吸收,促进畜禽高效增重。

1. 一种屎肠球菌的菌粉制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

a. 将屎肠球菌菌种接种于 MRS 液体培养基,在 25 ~ 40℃ 有氧或兼性条件下培养 8 ~ 16 小时,成为种子液;

b. 将步骤 a 所获得的种子液接种在发酵罐中进行发酵培养,采用改良的 MRS 液体培养基为发酵培养基,在 25 ~ 40℃ 厌氧条件下,采用定时或连续补料分批发酵方式培养 8 ~ 48 小时;

c. 将 b 步骤所获得的发酵液加入质量分数为 10%~40% 的干燥保护剂和卵黄粉,添加方式为:发酵液 1000ml 中,加入质量分数为 0.2%~0.5% 的吐温 60,然后缓缓加入干燥保护剂,边加边搅拌,直至混匀;然后在混合匀浆中加入质量分数为 5~15% 的卵黄粉,边加边搅拌,直至混匀制成菌液混合物,继续搅匀后进行喷雾干燥制成菌粉;所述的屎肠球菌为屎肠球菌 BBH201305001,已于 2013 年 10 月 9 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,菌种保藏代号:CGMCC No. 8296;

所述的干燥保护剂中各组分的质量比为:阿拉伯胶:β-糊精:蔗糖:淀粉=1~10:5~30:1~4:2~10;

改良 MRS 液体培养基是在每升 MRS 培养基中加有麦芽糖 5 ~10g,蛋白胨 10~15g,牛肉膏 8~10g,酵母膏 5~10g,葡萄糖 10~20.0g,磷酸氢二钾 1 ~ 5g,乙酸钠 1~10g,硫酸镁 0.2 ~ 1g,硫酸锰 0.001 ~ 0.2g,柠檬酸三胺 2 ~ 5g,吐温 80 1g,纯净水 1 升,调节 pH 值 5.5 ~ 8.0。

2. 根据权利要求 1 所述的一种屎肠球菌的菌粉制备方法,其特征在于:所述的喷雾干燥工艺指标:进口温度控制在 155-165℃ 之间,出口温度控制在 50-70℃ 之间,风压指数控制在 25-30 Mpa 之间,喷雾头变频为 400Hz。

3. 一种如权利要求 1 所述的屎肠球菌的菌粉制备方法制备的屎肠球菌的菌粉作为饲料添加剂使用。

一种屎肠球菌菌粉的制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于饲料添加剂加工领域,具体涉及了一种屎肠球菌菌粉的制备与应用。

背景技术

[0002] 屎肠球菌被认为是一种可在饲料中添加的肠道益生菌。大量研究表明,益生菌的应用是建立和维持动物肠道菌群平衡的最有效方式。在现代养殖条件下,尽早建立和维持动物肠道的菌群平衡是提高养殖动物生长机能和抗病力的可行途径。在饲料中添加益生菌等微生态饲料添加剂,一方面,益生菌进入消化道后,大量繁殖,并与消化道有益菌形成强有力的优势菌群,抑制其它外来微生物在胃肠道内的定植或增殖,从而维持肠道菌体平衡。另一方面,益生菌通过产生细菌素、过氧化氢、乳酸乃至有广谱抗菌作用的物质,能够抑制或杀灭其它有害微生物。同时,通过提高巨噬细胞和单核细胞的活性、促进免疫细胞分泌细胞因子,益生菌可以提高机体的免疫细胞水平。此外,益生菌能产生多种营养物质和消化酶,或刺激腺体对消化酶的分泌,从而促进营养物质的消化。更为重要的是采用益生菌添加剂能够加固肠道屏障功能,增加肠绒毛长度和隐窝深度,进一步加强机体对营养物质的消化吸收,提高生长效率。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种屎肠球菌菌粉的制备与应用,该菌粉可调整猪肠道菌群,促进畜禽高效增重,且生产工艺简单,成本低。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 一种屎肠球菌,所述的屎肠球菌为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) BBH201305001,已于2013年10月9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CGMCC,其地址为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,菌种保藏代号:CGMCC No. 8296。

[0006] 一种屎肠球菌的菌粉制备方法,其包括以下步骤:

[0007] a. 将屎肠球菌菌种接种于MRS液体培养基,在25~40℃有氧或兼性条件下培养8~16小时,成为种子液;

[0008] b. 将步骤a所获得的种子液接种在发酵罐中进行发酵培养,采用改良的MRS液体培养基为发酵培养基,在25~40℃厌氧条件下,采用定时或连续补料分批发酵方式培养8~48小时;

[0009] c. 将b步骤所获得的发酵液加入质量分数为10%~40%的干燥保护剂和卵黄粉,添加方式为:发酵液1000ml中,加入质量分数为0.2%~0.5%的吐温60,然后缓缓加入干燥保护剂,边加边搅拌,直至混匀;然后在混合匀浆中加入质量分数为5~15%的卵黄粉,边加边搅拌,直至混匀制成菌液混合物,继续搅匀后进行喷雾干燥制成菌粉。

[0010] 所述的干燥保护剂中各组分的质量比为:阿拉伯胶:β-糊精:蔗糖:淀粉=1~10:5~30:1~4:2~10。

[0011] 改良 MRS 液体培养基是在每升 MRS 培养基中加有麦芽糖 5 ~10g, 蛋白胨 10~15g, 牛肉膏 8~10g, 酵母膏 5~10g, 葡萄糖 10~20.0g, 磷酸氢二钾 1 ~ 5g, 乙酸钠 1~10g, 硫酸镁 0. 2 ~ 1g, 硫酸锰 0.001 ~ 0.2g, 柠檬酸三胺 2 ~ 5g, 吐温 80 1g, 纯净水 1 升, 调节 pH 值 5.5 ~ 8. 0。

[0012] 所述的喷雾干燥工艺指标:进口温度控制在 155-165℃之间,出口温度控制在 50-70℃之间,风压指数控制在 25-30 Mpa 之间,喷雾头变频为 400Hz。

[0013] 将喷雾干燥后的菌粉用生理盐水按比例稀释后计数,显示喷雾干燥后屎肠球菌菌粉中活菌数为 400-600 亿 /g。

[0014] 一种屎肠球菌的菌粉可作为饲料添加剂使用。

[0015] 菌株的筛选与鉴定:

[0016] 从猪场附近土壤取样,接种到 MRS 固体培养基平板上,于 37℃ 厌氧环境中培养 24h,挑取平板上的单菌落接种到 MRS 固体培养基斜面上进行 2 次纯化培养得到纯化菌落。该菌落在 MRS 培养基上生长良好,是兼性厌氧菌。菌落成乳白色圆形,表面较光滑,菌落直径约 0.8~2mm。革兰氏染色阳性,镜检发现,菌体呈球形,成单或成串存在,无芽孢。菌株送交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),经生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析鉴定,确定其属于肠球菌属、屎肠球菌种 (*Enterococcus faecium*),命名为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) BBH201305001。

[0017] 表 1 细胞形态及理化实验结果

[0018]

实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	阳性	碳水化合物产酸		碳水化合物产酸 (续)	
细胞形状	球状	D-葡萄糖	+	蔗糖	+
形成芽孢	-	D-果糖	+	麦芽糖	+
接触酶	-	D-甘露糖	+	海藻糖	+
氧化酶	-	D-核糖	+	蜜二糖	+
空气中生长	+	D-木糖	-	纤维二糖	+
45℃ 生长	+	L-木糖	-	松三糖	-
10℃ 生长	+	D-半乳糖	+	棉子糖	-
6.5% NaCl 生长	+	L-阿拉伯糖	+	山梨醇	-
pH9.6 生长	+	L-山梨糖	-	甘露醇	+
pH4.5 生长	-	L-鼠李糖	-	葡萄糖酸钠	+
		乳糖	+	七叶灵	+
		蔗糖仁苷	+	水杨苷	+

[0019] 本发明的优点在于:可调整猪肠道菌群,提高机体的免疫细胞水平,加固肠道屏障功能,加强机体对营养物质的消化吸收,促进畜禽高效增重,生产工艺简单,可提供成本低的屎肠球菌菌粉。

附图说明

[0020] 图 1 屎肠球菌菌粉的显微结构观察,菌粉颗粒包裹均匀,分散度较好。

具体实施方式

[0021] 实施例 1 对屎肠球菌菌粉的显微结构观察

[0022] 结论：菌粉颗粒包裹均匀，分散度较好。

[0023] 实施例 2：

[0024] 菌粉的稳定性检测

[0025] 1.1 菌粉的高温耐受性

[0026] 取 1g 菌粉样品，分别置于 50、80、100℃ 下高温干燥 30 分钟，60 分钟，与原制剂比较，测定制剂内屎肠球菌的存活率。

[0027] 结果：

[0028]

参数	初始样品	50 ℃		80 ℃		100 ℃	
		30min	60min	30min	60min	30min	60min
菌落数	400 亿/g	400 亿/g	380 亿/g	200 亿/g	150 亿/g	15 亿/g	5 亿/g
得率	/	100%	95%	50%	3.5%	3.75%	1.25%

[0029] 结论：本发明中的屎肠球菌可短时间耐受 50-80℃ 高温；

[0030] 1.1.2 菌粉的稳定性

[0031] 将试样放入铝箔袋中，密封遮光，于 47.5℃ 下恒温培养一周，取出交进行活菌计数。

[0032] 结果：一周后检测到样品活菌浓度为 180 亿 /g，存活率为 45%。

[0033] 结论：本发明中的屎肠球菌可在较高温度下存活。

[0034] 1.1.3 肠溶性试验

[0035] 取样品 0.1g，加入 50ml ph 6.8 的人工肠液中，37℃ 恒温水浴搅拌，搅拌速度为 200r/min，分别在 30min、60 min、90min、120min 取样进行活菌计数。

[0036] 结果：

[0037]

参数	初始样品	30min	60min	90min	120min
菌落数	400 亿/g	200 亿/g	180 亿/g	115 亿/g	90 亿/g
得率	/	50%	45%	28.75%	22.5%

[0038] 结论：本发明中的屎肠球菌对于人工肠液有较好的耐受性。

[0039] 1.1.4 耐酸性试验

[0040] 取样品 0.1g，加入 50ml 人工胃液中，37℃ 恒温水浴搅拌，搅拌速度为 200r/min，分别在 30min、60 min、90min、120min 取样进行活菌计数。

[0041] 结果：

[0042]

参数	初始样品	30min	60min	90min	120min
菌落数	400 亿/g	50 亿/g	30 亿/g	25 亿/g	25 亿/g
得率	/	12.5%	7.5%	6.25%	6.25%

[0043] 结论：本发明中的屎肠球菌对于人工胃液有部分耐受性，且在 60min 后有较好的稳定性。

[0044] 实施例 3 本发明实例生猪小规模试验

[0045] 试验动物:断奶仔猪 50 头;

[0046] 试验时间:从 22 日龄断奶期开始,持续 2 周时间;

[0047] 饲料喂养:不控料自由采食,设置 2 个实验组,分别为不添加制剂的对照组,制剂含量 0.3‰的试验组;

[0048] 结果:

[0049]

项目	试验组	对照组
断奶后初始均重 (kg/头)	6.86	6.91
2 周后均重 (kg/头)	10.09	9.27
增重	3.23	2.36
采食量 (kg/头)	4.86	4.22
料肉比	1.50	1.79
拉稀率 (%)	1.2	3.4
死亡率 (%)	0	0

[0050] 结论:通过上述实验,试验组比对照组在增重、采食量上分别提高 37% 和 15%,在料肉比和拉稀率上分别下降 16% 和 65%。因此,本发明对于断奶仔猪具有明显的提高采食量、增重和降低拉稀的作用。

[0051] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

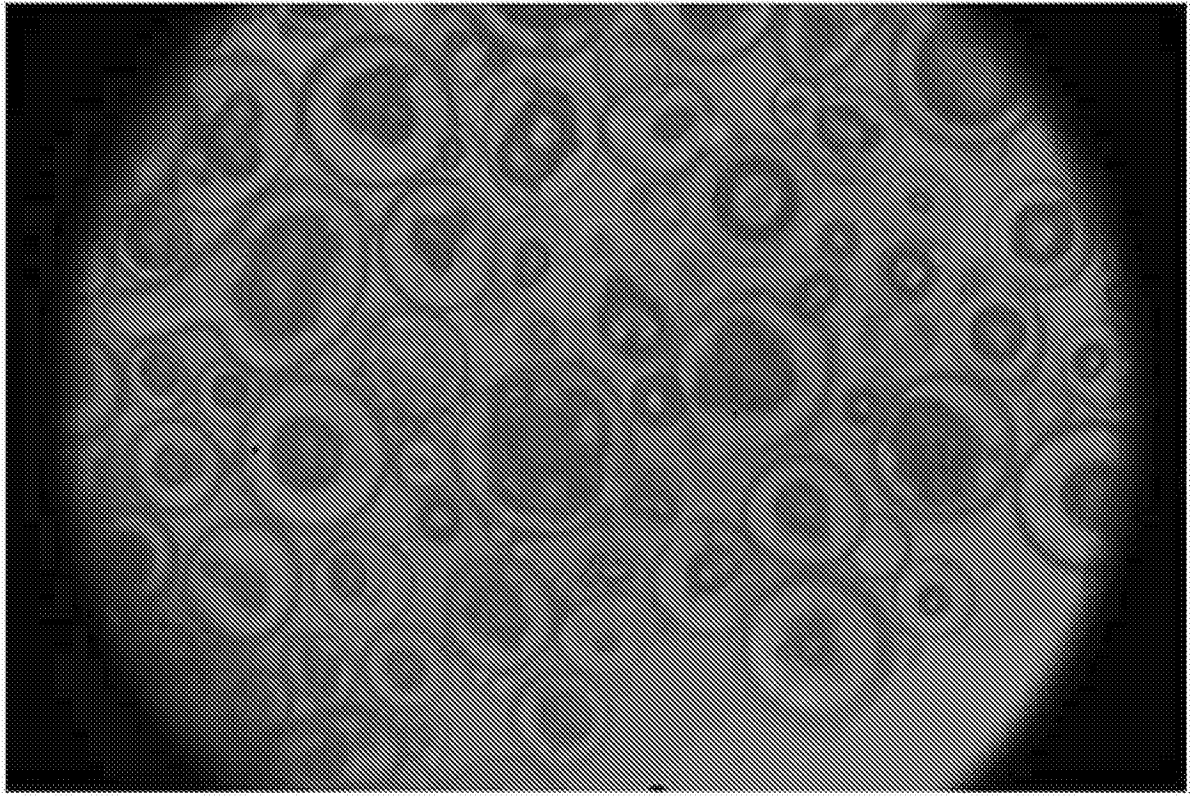


图 1