



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106376725 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610729882.4 *C12R 1/685(2006.01)*
(22)申请日 2016.08.25 *C12R 1/10(2006.01)*
(71)申请人 北京康缘益生生物科技有限公司 *C12R 1/07(2006.01)*
地址 102206 北京市昌平区回龙观镇北清 *C12R 1/125(2006.01)*
路1号院8号楼2单元802室 *C12R 1/25(2006.01)*
C12R 1/72(2006.01)
(72)发明人 张传军 张晓红 张中亲 任存邦
张宪德 张亚洁
(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限
公司 21002
代理人 李颖 周秀梅
(51)Int.Cl.
A23K 10/18(2016.01)
C12N 1/20(2006.01)
C12N 1/14(2006.01)
C12N 1/16(2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

(54)发明名称

一种生物发酵饲料及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物饲料,具体的说是一种生物发酵饲料及其制备方法。将黑曲霉、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌、产朊假丝酵母分别经二级液体发酵培养,而后再经三级固体发酵培养,发酵后培养物即获得生物饲料;本发明发酵饲料运用神经网络、模式识别、遗传算法等各种优化方法,优化了发酵条件,根据代谢工程原理,构建生物合成网络,在此基础上对其合成网络进行途径分析及代谢流量控制,采用酶解、厌氧、好养、培菌等工艺过程,提高了蛋白质的含量,降低了粗纤维的含量,改善了适口性和香味,增加了有益菌,去除了饲料原料中的毒素。

1. 一种生物发酵饲料,其特征在于:将真菌、酵母菌、乳酸菌以及有益芽孢杆菌,分别经二级液体发酵培养,而后再经三级固体发酵培养,发酵后培养物即为生物饲料。

2. 按权利要求1所述的生物发酵饲料,其特征在于:将黑曲霉、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌和产朊假丝酵母分别制成菌悬液,而后分别接种至各自菌种活化用固体培养基中活化培养,纯化后各菌株分别经二级液体发酵扩大培养,而后将黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液接种于固体发酵培养基中进行第一级固体发酵,好氧发酵培养至30~48h,再接种植物乳杆菌和产朊假丝酵母的发酵培养液,进行第二级固体发酵,厌氧发酵,继续培养至96~120h,最后接入枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的发酵培养液,进行第三级固体发酵,好氧发酵继续培养至150~200h,即为发酵饲料;其中,真菌培养温度25~37℃,pH为5.0~6.0;酵母菌培养温度28~30℃,pH为5.0~6.0;乳酸菌培养温度30~38℃,pH为4.0~5.0;枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌培养温度30~40℃,pH为6.0~8.0;凝结芽孢杆菌培养温度35~45℃,pH为7.0~8.0;

按重量百分比计,固体发酵培养基为:木薯渣(40%~60%)、棕榈粕(30%~10%)、葡萄糖(0.1%~6.0%)、玉米粉(1.0%~20%)、豆粕粉(2.0%~40%)、硫酸铵(0.1%~5.0%)、尿素(0.1%~10%)、磷酸二氢钾(0.01%~10%)、余量为水,pH=5.5~7.5。

3. 按权利要求2所述的生物发酵饲料,其特征在于:所述黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液按(1~30):(1~70)的体积比混合后,再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中;

所述植物乳杆菌、产朊假丝酵母所得的发酵培养液按(1~50):(1~50)的体积比混合后,再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中;

所述枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌所得的发酵培养液按(1~50):(1~50)的体积比混合后,再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中。

4. 按权利要求2所述的生物发酵饲料,其特征在于:所述黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得的发酵培养液接种至固体发酵培养基中,于25℃~37℃,按照1:0.8~1:1.1的通气比,进行通气搅拌好氧发酵,培养30~48h,且还原糖的浓度 $\geq 1.5\%$;再接种产朊假丝酵母和植物乳杆菌的发酵培养液,于30℃~40℃进行厌氧发酵,继续培养至96~120h,最后接入枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的发酵培养液,按照1:1~1:1.3的通气比,通气搅拌好氧发酵,于37℃~45℃继续培养至150h~200h,即得发酵饲料。

5. 一种权利要求1所述的生物发酵饲料的制备方法,其特征在于:将真菌、酵母菌、乳酸菌以及有益芽孢杆菌,分别经二级液体发酵培养,而后再经三级固体发酵培养,发酵后培养物即为生物饲料。

6. 按权利要求4所述的生物发酵饲料的制备方法,其特征在于:将黑曲霉、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌和产朊假丝酵母分别制成菌悬液,而后先将黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液接种于固体发酵培养基中进行第一级固体发酵,好氧发酵培养至30~48h,再接种植物乳杆菌和产朊假丝酵母的发酵培养液,进行第二级固体发酵,厌氧发酵,继续培养至96~120h,最后接入枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的发酵培养液,进行第三级固体发酵,好氧发酵继续培养至150~200h,即为发酵饲料;

其中,真菌培养温度25~37℃,pH为5.0~6.0;酵母菌培养温度28~30℃,pH为5.0~6.0;乳酸菌培养温度30~38℃,pH为4.0~5.0;枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌培养温度30~

40℃, pH为6.0~8.0;凝结芽孢杆菌培养温度35~45℃, pH为7.0~8.0;

按重量百分比计, 固体发酵培养基为: 木薯渣(40%~60%)、棕榈粕(30%~10%)、葡萄糖(0.1%~6.0%)、玉米粉(1.0%~20%)、豆粕粉(2.0%~40%)、硫酸铵(0.1%~5.0%)、尿素(0.1%~10%)、磷酸二氢钾(0.01%~10%)、余量为水, pH=5.5~7.5。

7. 按权利要求6所述的生物发酵饲料的制备方法, 其特征在于:

所述黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液按(1~30):(1~70)的体积比混合后, 再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中;

所述植物乳杆菌、产朊假丝酵母所得的发酵培养液按(1~50):(1~50)的体积比混合后, 再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中;

所述枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌所得的发酵培养液按(1~50):(1~50)的体积比混合后, 再以10~50%的比例接种至固体发酵培养基中。

8. 按权利要求6所述的生物发酵饲料的制备方法, 其特征在于: 所述黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液接种至固体发酵培养基中, 于25℃~37℃, 按照1:0.8~1:1.1的通气比, 进行通气搅拌好氧发酵, 培养至30~48h, 且还原糖的浓度 $\geq 1.5\%$; 再接种产朊假丝酵母和植物乳杆菌的发酵培养液, 于30℃~40℃进行厌氧发酵, 继续培养至96~120h, 最后接入枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的发酵培养液, 按照1:1~1:1.3的通气比, 通气搅拌好氧发酵, 于37℃~45℃继续培养至150h~200h, 即得发酵饲料。

9. 一种权利要求1所述的生物发酵饲料的应用, 其特征在于: 所述生物饲料作为混合型饲料添加剂或单胃动物配合饲料的应用。

一种生物发酵饲料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物饲料,具体的说是一种生物发酵饲料及其制备方法。

背景技术

[0002] 饲料和粮食生产一直是我国国民经济的薄弱环节。由于受人口增长、耕地减少和肉食品消费增加的影响,我国粮食供需平衡十分脆弱。我国人均占有粮食一直在400kg以下,其中粮食总产量的40%左右用于饲料生产。在耕地和水资源长期紧缺的情况下,我国粮食产量已很难提高,因此长期制约着我国农牧业的发展的饲料资源短缺问题,尤其是蛋白质饲料的严重不足在短期内得不到有效解决。

[0003] 发展高效饲料工业,提高粮食向畜牧产品的转化效率和饲料利用率、开发新型蛋白饲料是满足人民对肉、禽、鱼、蛋越来越大的需求量的最佳途径。

[0004] 生物饲料开发国家工程研究中心专家们对生物饲料的定义为:生物饲料一般是指以饲料和饲料添加剂为对象,以基因工程、蛋白质工程、发酵工程等高新技术为手段,利用微生物工程发酵开发的新型饲料资源和饲料添加剂。

[0005] 世界范围内开发的生物饲料产品已达数十个品种,已成为一个较大的产业,主要包括饲料酶制剂、饲用氨基酸和维生素、益生菌(直接饲喂微生物)、饲料用寡聚糖、植物天然提取物、生物活性寡肽、饲料用生物色素、新型饲料蛋白、生物药物饲料添加剂等。而我国研究和生产过程中更加关注的则主要包括饲用酶制剂、益生菌、生物活性寡肽和寡糖等。

[0006] 利用微生物生产的饲料蛋白、酶制剂、氨基酸、维生素、抗生素和益生菌等相关产品,可以弥补常规饲料中容易缺乏的氨基酸等物质,而且能使其他粗饲料原料营养成分迅速转化,达到增强消化吸收利用效果。

[0007] 粗饲料是指在饲料中天然水分含量在60%以下,干物质中粗纤维含量等于或高于18%,并以风干物形式饲喂的饲料。如牧草、农作物秸秆、酒糟等。

[0008] 对于粗饲料而言,单胃动物没有相关的内源性酶来消化吸收(动物的内源酶包括蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等)。所以单胃动物消耗粗饲料必须借助外源性酶类,如纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、果胶酶和β-葡聚糖酶等。

[0009] 棕榈仁粕是棕榈仁脱壳榨油后的副产品,形状、颜色与菜子粕相似,气味略有巧克力气味,棕榈仁粕视其脱壳程度和加工工艺,品质相差很大(与棉粕工艺相似)。使用棕榈仁粕替代部分玉米,最直接的表现是:饲养效果不变,但饲料成本大幅降低,畜产品在同行中的竞争力明显提高。而其目前比玉米每吨便宜400元左右,随着我国北方地区及华北地区的玉米价格涨势过猛,畜产品价格长期低迷,一些大中型饲料企业必须千方百计降低成本才能生存,所以,在目前的形势下,使用棕榈仁粕替代部分玉米便成了首选产品。

[0010] 表1:棕榈仁粕的营养成分

[0011]

成分	含量	参考文献
干物质/%	94	Sundu 等, 2005c
粗蛋白质/%	14~21	Sundu 等, 2005c;
总能/ (Mcal/kg)	4.998	Nwokolo 等, 1976;
消化能/ (Mcal/kg)	2-3	Onwudike, 1986

[0012]

代谢能/ (Mcal/kg)	1.7-2.5	Sundu 等, 2005c
粗纤维/%	21~23	编者注
脂类/%	8~17	编者注
灰分/%	3~6	Sundu 等, 2005c; Sue, 2001

[0013] 木薯渣是淀粉厂利用木薯提取淀粉后剩余的副产品,其能量一般在2.3Mcal/kg左右,消化能10.08MJ/kg,代谢能9.5MJ/kg,是一种比较廉价的能量饲料,而价格约为玉米的60%。木薯渣还可替代部分玉米及糠麸类饲料,进而提高畜禽养殖经济效益,同时可以消除淀粉厂木薯渣引起的环境污染,变废为宝,提高生产企业循环经济效益,缓解能量饲料紧缺的矛盾。

[0014] 木薯渣含有丰富的碳水化合物,其中无氮浸出物达到70%左右,尽管其中含有大量的粗纤维,但由于粗纤维主要是由纯度比较高,几乎没有木质素和半纤维素缠绕的纤维素组成,所以,相对于反刍动物来说,消化吸收率极高,而对于单胃动物来说,需要进行微生物发酵降解。

[0015] 木薯渣含有丰富的微量元素,据胡忠泽等对木薯渣干物质中的微量元素进行检测发现:木薯渣含铜30mg/kg,锌66mg/kg,锰20mg/kg。

[0016] 表2:木薯渣营养成分

[0017]

水分 (%)	粗蛋白质 CP (%)	粗脂肪 EE (%)	粗纤维 CF (%)	无氮浸出物 NFE (%)	粗灰分 Ash (%)	代谢能 (Mcal /kg)	消化能 (Mcal /kg)
12.0-14.0	1.8-3.5	3.0-3.6	6.0-13.0	72-78	1-3	2.27	2.4

发明内容

[0018] 本发明目的在于提供一种生物发酵饲料及其制备方法。

[0019] 为实现上述目的,本发明采用技术方案为:

[0020] 一种生物发酵饲料的制备方法为将真菌、酵母菌、乳酸菌以及有益芽孢杆菌,分别经二级液体发酵培养,而后再经三级固体发酵培养,发酵后培养物即为生物饲料;其中真菌为黑曲霉、酵母菌为产朊假丝酵母,乳酸菌为植物乳杆菌,有益芽孢杆菌为地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。

[0021] 发酵后培养物粗蛋白 $\geq 20\%$,粗纤维 $\leq 8\%$,水分 $\leq 20\%$,粗灰分 $\leq 10\%$,赖氨酸 $\geq 2.5\%$,有益活菌数(以凝结芽孢杆菌计) ≥ 50 亿/克。

[0022] 进一步的说,将黑曲霉、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌和产朊假丝酵母分别制成菌悬液,而后分别接种至各自菌种活化用固体培养基中,在适宜的温度下培养,一般连续活化3~5次,活化后进行菌种纯化;纯化后各菌株分别经二级液体发酵扩大培养,先将黑曲霉、地衣芽孢杆菌所得发酵培养液接种至固体发酵培养基中,于25℃~37℃,按照1:0.8~1:1.1的通气比,进行通气搅拌好氧发酵,培养至30~48h,且还原糖的浓度 $\geq 1.5\%$;再接种产朊假丝酵母和植物乳杆菌的发酵培养液,于30℃~40℃进行厌氧发酵,继续培养至96~120h,最后接入枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的发酵培养液,按照1:1~1:1.3的通气比,通气搅拌好氧发酵,于37℃~45℃继续培养至150h~200h,即得发酵饲料。

[0023] 上述,通气比指单位时间内通过单位重量的固体发酵培养基的无菌空气的体积。比如“1:1”指每分钟通过1公斤固体发酵培养基无菌空气的体积是1升。

[0024] 其中,真菌培养温度25~37℃,pH为5.0~6.0;酵母菌培养温度28~30℃,pH为5.0~6.0;乳酸菌培养温度30~38℃,pH为4.0~5.0;枯草、地衣芽孢菌培养温度30~40℃,pH为6.0~8.0;凝结芽孢杆菌培养温度35~45℃,pH为7.0~8.0。按重量百分比计,固体发酵培养基为:木薯渣(40%~60%)、棕榈粕(30%~10%)、葡萄糖(0.1%~6.0%)、玉米粉(1.0%~20%)、豆粕粉(2.0%~40%)、硫酸铵(0.1%~5.0%)、尿素(0.1%~10%)、磷酸二氢钾(0.01%~10%)、余量为水,pH=5.5~7.5;121℃~125℃,灭菌35min~60min。

[0025] 菌种组合:指每个菌种纯种液体发酵获得的第二级发酵液的体积按照下述比例混合(1)第一组合,黑曲霉:地衣芽孢杆菌=(1~30):(1~70);(2)第二组合,植物乳杆菌:产朊假丝酵母=(1~50):(1~50);(3)第三组合,枯草芽孢杆菌:凝结芽孢杆菌=(1~50):(1~50)

[0026] 接种量:指液体菌种组合的体积(L)占固体发酵培养基(公斤)重量的百分比(1)第一组合菌种的接种量:10~50%;(2)第二组合菌种的接种量:10~50%;(3)第三组合菌种的接种量:10~50%

[0027] 接种方式与培养:通气比指单位时间内通过单位重量的固体发酵培养基的无菌空气的体积。比如“1:1”指每分钟通过1公斤固体发酵培养基无菌空气的体积是1升。

[0028] (1)第一菌种组合接种与培养:当固体发酵培养基消后降温至25℃~37℃,按照10~50%接种量接入第一菌种组合,按照1:0.8~1:1.0的通气比,通气搅拌好氧培养至30h~48h.进行第一级固体发酵。

[0029] (2)第二菌种组合接种与培养:当第一级固体发酵培养至30~48h时,且还原糖的浓度 $\geq 1.5\%$ 时,按照10~50%接种量接入第二菌种组合,于30℃~40℃,兼性厌氧培养,继续培养至96h~120h.进行第二级固体发酵。

[0030] (3)第三菌种组合接种与培养:当第二级固体发酵培养至96~120h时,且pH ≤ 5.0 时,按照10~50%接种量接入第三菌种组合,于37℃~45℃,按照1:1~1:1.3的通气比,通气搅拌继续培养至150h~200h.进行第三级固体发酵。

[0031] 更进一步的说,

[0032] 1.活化菌种

[0033] 将黑曲霉、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌和产朊假丝酵母分别制成菌悬液,而后分别接种至各自菌种活化用固体培养基中在适宜的温度下培养,一般连续活化3~5次,活化后进行菌种纯化;其中,各自菌种活化用固体培养基分别为(重量比)

[0034] (1) 真菌(黑曲霉):马铃薯20%~30%、葡萄糖10%~20%、琼脂粉1.0%~2.5%、余量为纯净水,pH5.0~6.0;120℃~123℃,灭菌15~30分钟。

[0035] (2) 酵母菌(产朊假丝酵母):麦芽汁固体培养基:麦芽汁(波美度=5~12)、琼脂粉1.0%~2.5%。余量为纯净水,pH5.0~6.0;120℃~123℃,灭菌15~30分钟。

[0036] (3) 枯草芽孢杆菌:蛋白胨0.1%~5.7%、牛肉膏0.1%~10%、氯化钠1.1%~9.2%、琼脂粉1.0%~2.5%、余量为纯净水,pH=6.3~7.5;120℃~123℃,灭菌15~30分钟。

[0037] (4) 地衣芽孢杆菌:蛋白胨0.1%~5.7%、牛肉膏0.1%~10%、氯化钠1.1%~9.2%、琼脂粉1.0%~2.5%、余量为纯净水,pH=6.3~7.5;120℃~123℃,灭菌15~30分钟。

[0038] (5) 植物乳杆菌:蛋白胨0.1%~5.5%、牛肉浸粉0.1%~5.0%、酵母浸粉0.1%~10%、葡萄糖1.2%~12%、磷酸氢二钾0.1%~10%、柠檬酸氢二铵0.1%~5.5%、乙酸钠0.1%~3.9%、硫酸镁0.1%~7.5%、硫酸锰0.01%~5.5%、琼脂粉1.2%~2.5%、吐温80 0.01%~5.0%、余量为纯净水,pH=4.5~6.0;120℃~123℃,灭菌15分钟~30分钟。

[0039] (6) 凝结芽孢杆菌:酵母膏0.2%~7.5%、蛋白胨0.2%~12%、氯化钠1.2%~12%、琼脂粉1.2%~2.5%、余量为纯净水,pH=6.0~7.5;120℃~123℃,灭菌15分钟~30分钟。

[0040] 各菌株的活化培养条件:

[0041] 真菌(黑曲霉):25℃~33℃,恒温培养5~7天,直至孢子成熟,孢子率≥90%。

[0042] 酵母菌(产朊假丝酵母):25℃~30℃,恒温培养2~5天,直至菌苔丰满。

[0043] 枯草芽孢杆菌:30℃~37℃,恒温培养1~4天,直至芽孢成熟,芽孢率≥90%。

[0044] 地衣芽孢杆菌:30℃~37℃,恒温培养1~4天,直至芽孢成熟。芽孢率≥90%。

[0045] 植物乳杆菌:30℃~37℃,恒温培养1~7天,直至菌苔丰满。

[0046] 凝结芽孢杆菌:37℃~45℃,恒温培养1~4天,直至芽孢成熟,芽孢率≥90%。

菌种纯化及定向筛选

[0047] 1) 真菌:黑曲霉的纤维素酶活性筛选

[0048] (1) 分离平板(重量比):硫酸铵0.02%~7.5%、硫酸镁0.02%~3.5%、磷酸二氢钾0.2%~7.5%、氯化钠4%~7.5%、羧甲基纤维素钠3.5%~10%、刚果红0.2%~7.5%、琼脂1.1%~3.5%、余量为纯净水,pH=6.3~7.5;120℃~122℃,灭菌20~30min。

[0049] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的孢子洗为孢子悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0050] (3) 培养:涂布后的分离平板28℃~30℃,恒温培养5~7天,直至有透明水解圈长出。

[0051] (4) 挑单:按照水解圈直径与菌落直径的比值进行选取,将比值大的单菌落逐一编号后,对应传入斜面进行培养。(斜面培养基同活化固体培养基)

[0052] 2) 地衣芽孢杆菌:漆酶活性及过氧化物酶活性筛选(分解木质素)方法参考:《木质素酶及其生产菌的筛选育种》基因组学与应用生物学,2009年,第28卷,第三期578-582中记载的漆酶活性筛选:鞣酸平板法(PDA-bavendamm)以及过氧化物酶活性筛选:亮蓝平板法(PDA-RB)。

[0053] 3) 产朊假丝酵母:

[0054] (1) 分离平板(重量比):葡萄糖1.1%~3.5%、蛋白胨1.1%~3.5%、酵母浸出粉1.1%~3.5%,琼脂粉1.1%~3.5%、余量为纯净水。pH=4.5-6.0。120℃~122℃,灭菌20~30min

[0055] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0056] (3) 培养:涂布后的分离平板28℃~30℃,恒温培养2~4天

[0057] (4) 挑单:正常菌落形态:乳白色、细腻、边缘整齐、中型、微凸。单菌落逐一编号后,对应传入斜面进行培养。。

[0058] 4) 枯草芽孢杆菌:蛋白酶活性及抑菌能力筛选

[0059] (1) 分离平板:营养琼脂平板(同菌种活化)

[0060] (2) 筛选平板:A:蛋白酶筛选平板:在营养琼脂培养基中加入10%~20%的无菌的脱脂牛奶溶液(预先于115℃,灭菌15min);

[0061] B:抑菌物质筛选平板

[0062] 上层培养基:营养琼脂培养基,按照重量体积比加入培养基体积0.2%~1.0%的琼脂粉;

[0063] 下层培养基:营养琼脂培养基,按照重量体积比加入培养基体积1.5%~2.5%的琼脂粉;

[0064] 制备:在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌的上层培养基。凝固备用。

[0065] (3) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0066] (4) 培养:涂布后的分离平板30℃~37℃,恒温培养1~3天.长出单菌落。

[0067] (5) 点种选择性平板:将正常的菌落逐一编号,并用无菌牙签对应点种接入选择性A、B两种平板。于30℃~37℃,恒温培养1~7天.在A平板上有透明的蛋白酶水解圈产生;在B平板上有透明的抑菌圈产生。

[0068] (6) 挑单:根据蛋白水解圈与大肠杆菌抑菌圈的大小与菌落直径的比值,将分离平板中的对应单菌落接入营养琼脂斜面进行培养。

[0069] 5) 植物乳杆菌:乳酸分泌能力筛选

[0070] (1) 分离平板:活化固体培养基,按照重量体积比加入培养基体积1.5%~5.5%的碳酸钙

[0071] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0072] (3) 培养:涂布后的分离平板30℃~37℃,恒温培养1~4天,直至长出透明圈。

[0073] (4)挑单:根据透明圈的大小与单菌落直径的比值,将单菌落逐一编号,接入活化固体斜面进行培养。

[0074] 6)凝结芽孢杆菌:淀粉酶活性、蛋白酶活性及抑菌物质分泌能力筛选

[0075] (1)分离平板培养基(重量比):酵母膏0.1%~5.0%、蛋白胨0.1%~5.0%、氯化钠0.1%~5.0%、琼脂粉0.1%~5.0%、余量为纯净水。pH=5.5~8.0。120℃~123℃,灭菌15~30min

[0076] (2)淀粉酶活性筛选:固体斜面培养基,按照重量体积比加入培养基体积2~10%工业淀粉;

[0077] (3)蛋白酶活性筛选:固体斜面培养基,按照重量体积比加入培养基体积10~30%的无菌的浓度为10%~30%的脱脂牛奶溶液。

[0078] (4)抗菌物质筛选

[0079] 上层培养基:分离平板培养基,按照重量体积比加入培养基体积0.2%~1.0%的琼脂粉

[0080] 下层培养基:分离平板培养基,按照重量体积比加入培养基体积1.5%~2.5%的琼脂粉

[0081] 在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌的上层培养基。凝固备用。

[0082] (5)操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。于37℃~45℃,培养48~72h。用无菌的牙签,将典型的单菌落逐一点种至淀粉酶筛选平板、蛋白酶筛选平板、抑菌物质筛选平板。于37℃~45℃,培养48~72h。根据水解圈及抑菌圈直径与菌落直径的比值,进行取舍。

[0083] 3.摇瓶液体菌种的制备

[0084] 1)黑曲霉

[0085] (1)一级种瓶制备培养基(重量比):蔗糖1%~5%、硝酸钠1%~10%、七水硫酸镁0.1%~10%、氯化钾0.2%~10%、七水硫酸亚铁0.001%~1%、磷酸氢二钾0.2%~5%、余量为自来水,pH=5.0~6.5;

[0086] 装量:50~100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~2cm²/种子瓶、培养:180~220rpm、25℃~30℃、30h~48h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀。生物量≥25%

[0087] (2)二级种瓶制备:培养基(重量比):木薯渣0.1%~10%、棕榈粕0.1%~10%、葡萄糖0.1%~10%、玉米粉0.1%~10%、豆粕粉0.1%~10%、硫酸铵0.1%~5%、尿素0.1%~10%、磷酸二氢钾0.1%~10%、余量为自来水,pH=5.0~6.5。

[0088] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:2~20%(一级摇瓶种子液的体积占二级摇瓶消后培养基体积的百分比)培养:180~220rpm、28℃~30℃、24h~72h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀。生物量≥30%

[0089] 2)产朊假丝酵母培养基(重量比):葡萄糖1%~10%、蛋白胨0.2%~5%、酵母浸出粉0.1%~7.4、余量为自来水pH=5.0~6.5

[0090] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~5cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~30℃、12h~16h、标准:菌体粗壮、卵圆形、菌型一致、着色均匀。OD_{600nm}≥2.0.

[0091] 3) 枯草芽孢杆菌培养基(重量比):胰蛋白胨1%~10%、酵母提取物1%~10%、NaCl1%~10%、余量为自来水,pH=6.0~7.5。

[0092] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~5cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、12h~16h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状。OD_{600nm}≥2.0.

[0093] 4) 地衣芽孢杆菌培养基(重量比):胰蛋白胨1%~10%、酵母提取物1%~10%、NaCl1%~10%、余量为自来水,pH=6.0~7.5。

[0094] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~5cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、12h~16h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状。OD_{600nm}≥2.0.

[0095] 5) 植物乳杆菌培养基(重量比):蛋白胨1%~10%、牛肉浸粉1%~10%、酵母浸粉1%~10%、葡萄糖1%~10%、磷酸氢二钾1%~10%、柠檬酸氢二铵1%~10%、乙酸钠1%~10%、硫酸镁1%~10%、硫酸锰1%~10%、余量为自来水,pH=5.5~6.5。

[0096] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~6cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、24h~72h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状。OD_{600nm}≥2.0.

[0097] 6) 凝结芽孢杆菌培养基(重量比)胰蛋白胨0.1%~12%、酵母提取物0.1%~5%、NaCl 1.1%~12%、葡萄糖1%~20%,余量为自来水;pH=6.0~7.5。

[0098] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1~6cm²/种子瓶、培养:180rpm、38℃~50℃、12h~46h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状。OD_{600nm}≥2.0.

[0099] 4. 一级种罐种子液制备

[0100] 首先,在50L的一级种罐内,按照下述配方,配制一级种子罐培养基,并在罐内加入20L~30L的地下水,于123℃,实消35min。使得消后体积为30L~40L。降温至培养温度待接种。

[0101] 其次,在无菌条件下将符合标准的各自菌株的摇瓶液体种子液合并在一起,每个菌种为100ml~500ml。

[0102] 最后,在火焰的保护下,将合瓶后摇瓶种子液投入对应的一级种子罐内。于适宜的条件下培养一定的时间,得一级种子罐种子液。

[0103] 所述各菌种的一级种子罐培养基及培养条件如下,以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指摇瓶液体种子液体积占一级种子罐消后培养基体积的百分比。通气比指单位时间内通过单位体积的液体发酵培养基的无菌空气的体积。比如“1:1”指每分钟通过1升液体发酵培养基无菌空气的体积是1升。

[0104] 1) 黑曲霉

[0105] 培养基(重量比):木薯渣(2%~5%)、棕榈粕(2%~10%)、葡萄糖(1%~10%)、玉米粉(2%~5%)、豆粕粉(1%~10%)、硫酸铵(0.5%~5%)、尿素(0.5%~10%)、磷酸二氢钾(0.1%~5%)、余量为地下水,pH=5.0~6.0。

[0106] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,35min~60min、接种量:0.5%~1%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:25℃~33℃、36h~48h、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状。生物量≥20%

[0107] 2) 产朊假丝酵母

[0108] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~15%)、蛋白胨(0.2%~10%)、酵母浸出粉(0.5%~13%)、余量为地下水;pH=5.0~6.5。

[0109] 装量:70%~85%、灭菌:115℃~120℃,15min~30min、接种量:0.5%~1%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~35℃、12h~16h。标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀、 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0110] 3) 枯草芽孢杆菌

[0111] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、豆饼粉(1%~10%)、花生饼粉(1%~10%)、玉米粉(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~6.8%)、酵母浸粉(0.1%~5.0%)、碳酸钙(0.2%~10%)、余量为地下水,pH=6.3~7.5。

[0112] 装量:55%~70%、灭菌:120℃~125℃,30min~40min、接种量:0.2%~1%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~37℃、12h~18h、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀。生物量 $\geq 10\%$

[0113] 4) 地衣芽孢杆菌

[0114] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、豆饼粉(1%~10%)、花生饼粉(1%~10%)、玉米粉(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~6.8%)、酵母浸粉(0.1%~5.0%)、碳酸钙(0.2%~10%)、余量为地下水,pH=6.3~7.5。

[0115] 装量:55%~70%、灭菌:120℃~125℃,30min~40min、接种量:0.2%~1%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~37℃、12h~18h、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀。生物量 $\geq 10\%$

[0116] 5) 植物乳杆菌

[0117] 培养基(重量比):蛋白胨(0.1%~6.0%)、牛肉浸粉(0.06%~5.5%)、酵母浸粉(1%~8%)、葡萄糖(1%~10%)、磷酸氢二钾(0.1%~5.0%)、柠檬酸氢二铵(0.1%~3.0%)、乙酸钠(0.1%~6.0%)、硫酸镁(0.01%~0.6%)、硫酸锰(0.001%~0.1%)、吐温(0.1%~0.9%)、余量为地下水,pH=5.4~7.0。

[0118] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,20min~35min、接种量:0.4~3%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~35℃、24h~72h标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0119] 6) 凝结芽孢杆菌

[0120] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~7%)、酵母膏(0.05%~7.25%)、七水硫酸镁(0.1%~5.3%)、磷酸氢二钾(0.15%~6.71%)、余量为地下水,pH=6.0~7.5。

[0121] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,20min~35min、接种量:0.4~3%、通气比:1:0.5~1:0.8、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:37℃~45℃、24h~72h、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0122] 5. 二级种子罐种子制备

[0123] 首先,在200L的种子罐内,按照下述配方配制二级种子培养基,加入100~120L的地下水,于适宜温度下进行实罐灭菌,使得消后体积为150~170L。降温至培养温度待接种。

[0124] 其次,二级种子罐培养基降温的同时,进行导种管路实消,125℃,60min。

[0125] 最后,待导种管路降温后,将达到标准的一级种罐种子液按照下述的接种量通过

无菌的导种管路,接入二级种子罐消后培养基内。于适宜条件下培养,得二级种子罐种子液。

[0126] 所述各菌种的二级种子罐培养基及培养条件如下:以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指一级种子罐种子液体积占二级种子罐消后培养基体积的百分比。通气比指单位时间内通过单位体积的液体发酵培养基的无菌空气的体积。比如“1:1”指每分钟通过1升液体发酵培养基无菌空气的体积是1升。

[0127] 1) 黑曲霉

[0128] 培养基(重量比):木薯渣(2%~5%)、棕榈粕(2%~10%)、葡萄糖(1%~10%)、玉米粉(2%~5%)、豆粕粉(1%~10%)、硫酸铵(0.5%~5%)、尿素(0.5%~10%)、磷酸二氢钾(0.1%~5%)、余量为地下水,pH=5.0~6.0。

[0129] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,35min~60min、接种量:1%~20%、通气比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:25℃~33℃、24h~48h、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状。生物量 $\geq 28\%$

[0130] 2) 产朊假丝酵母

[0131] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~15%)、蛋白胨(0.2%~10%)、酵母浸出粉(0.5%~13%)、余量为地下水,pH=5.0~6.5。

[0132] 装量:70%~85%、灭菌:115℃~120℃,15min~30min、接种量:5%~15%、通气比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~35℃、12h~16h。标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀。 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0133] 3) 枯草芽孢杆菌

[0134] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、豆饼粉(1%~10%)、花生饼粉(1%~10%)、玉米粉(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~6.8%)、酵母浸粉(0.1%~5.0%)、碳酸钙(0.2%~10%)、余量为地下水,pH=6.3~7.5。

[0135] 装量:55%~70%、灭菌:120℃~125℃,30min~40min、接种量:3%~18%、通气比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~37℃、12h~18h、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量 $\geq 10\%$ 。

[0136] 4) 地衣芽孢杆菌

[0137] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、豆饼粉(1%~10%)、花生饼粉(1%~10%)、玉米粉(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~6.8%)、酵母浸粉(0.1%~5.0%)、碳酸钙(0.2%~10%)、余量为地下水,pH=6.3~7.5。

[0138] 装量:55%~70%、灭菌:120℃~125℃,30min~40min、接种量:2%~22%、通气比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~37℃、12h~18h、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量 $\geq 10\%$ 。

[0139] 5) 植物乳杆菌

[0140] 培养基(重量比):蛋白胨(0.1%~6.0%)、牛肉浸粉(0.06%~5.5%)、酵母浸粉(1%~8%)、葡萄糖(1%~10%)、磷酸氢二钾(0.1%~5.0%)、柠檬酸氢二铵(0.1%~3.0%)、乙酸钠(0.1%~6.0%)、硫酸镁(0.01%~0.6%)、硫酸锰(0.001%~0.1%)、吐温(0.1%~0.9%)、余量为地下水,pH=5.4~6.5

[0141] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,20min~35min、接种量:10%~30%、通气

比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:28℃~35℃、24h~72h、标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0142] 6) 凝结芽孢杆菌

[0143] 培养基(重量比):葡萄糖(1%~10%)、蛋白胨(0.1%~7%)、酵母膏(0.05%~7.25%)、七水硫酸镁(0.1%~5.3%)、磷酸氢二钾(0.15%~6.71%)、余量为地下水,pH=6.0~7.5

[0144] 装量:70%~80%、灭菌:120℃~123℃,20min~35min、接种量:3~25%、通气比:1:0.6~1:1、罐压:0.03MPa~0.05MPa、培养:37℃~45℃、24h~72h、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、 $OD_{600nm} \geq 2.0$ 。

[0145] 6. 固体发酵

[0146] 1) 固体发酵培养基:木薯渣(40%~60%)、棕榈粕(30%~10%)、葡萄糖(0.1%~6.0%)、玉米粉(1.0%~20%)、豆粕粉(2.0%~40%)、硫酸铵(0.1%~5.0%)、尿素(0.1%~10%)、磷酸二氢钾(0.01%~10%)、余量为地下水,pH=5.5~7.5;121℃~125℃,灭菌35min~60min

[0147] 2) 菌种组合:指每个菌种纯种液体发酵过得的第二级发酵液体积按照下述比例混合

[0148] (1) 第一组合:黑曲霉:地衣芽孢杆菌=(1~30):(1~70)

[0149] (2) 第二组合:植物乳杆菌:产朊假丝酵母=(1~50):(1~50)

[0150] (3) 第三组合:枯草芽孢杆菌:凝结芽孢杆菌=(1~50):(1~50)

[0151] 接种量:指液体菌种组合后的体积占固体发酵培养基重量的百分比

[0152] (1) 第一组合菌种的接种量:10~50%

[0153] (2) 第二组合菌种的接种量:10~50%

[0154] (3) 第三组合菌种的接种量:10~50%

[0155] 接种方式与培养:通气比指单位时间内通过单位重量的固体发酵培养基得无菌空气的体积。比如“1:1”指每分钟通过1公斤固体发酵培养基无菌空气的体积是1升。

[0156] (1) 第一菌种组合接种与培养:当固体发酵培养基消后降温至25℃~37℃,按照10~50%接种量接入第一菌种组合,按照1:0.8~1:1.0的通气比,通气搅拌好氧培养至30h~48h。进行第一级固体发酵。

[0157] (2) 第二菌种组合接种与培养:当第一级固体发酵培养至大约培养30~48h时,且还原糖的浓度 $\geq 1.5\%$ 时,按照10~50%接种量接入第二菌种组合,于30℃~40℃,兼性厌氧培养,继续培养至96h~120h。进行第二级固体发酵。

[0158] (3) 第三菌种组合接种与培养:当第二级固体发酵培养至,96~120h时,且 $pH \leq 5.0$ 时,按照10~50%接种量接入第三菌种组合,于37℃~45℃,按照1:1~1:1.3的通气比,通气搅拌,继续培养至150h~200h。进行第三级固体发酵,

[0159] 5) 过程检测

[0160] (1) pH:自接后每6h检测一次(酸度计)

[0161] (2) 还原糖:自接后每6h检测一次(DNS法)

[0162] 6) 发酵结束终点判断

[0163] (1) 当 $pH \geq 7.5$ 、还原糖 $\leq 0.5\%$ 时,镜检产生大量厚垣孢子和芽孢($\geq 90\%$)结束发

酵。

[0164] (2) 周期: 大约150~200h

[0165] 7) 终产品检测项目

[0166] (1) 粗蛋白% \geq 20%: GB/T 6432-1994饲料粗蛋白测定方法

[0167] (2) 粗纤维% \leq 8%: GB/T 6434-2006饲料粗纤维的测定过滤法

[0168] (3) 水分% \leq 20%: 干燥失重法

[0169] (4) 粗灰分 \leq 10%: GB/T 6438-2007饲料中粗灰分的测定

[0170] (5) 赖氨酸含量% \geq 2.5: 茚三酮滴定法

[0171] (6) 活菌数(亿/g干物质) \geq 50(以凝结芽孢杆菌为准)

[0172] 方法: 计数平板(重量体积比)牛肉膏0.1%~5%、蛋白胨0.1%~5%、葡萄糖0.1%~15%、氯化钠1%~5%、溴甲酚紫0.01%~5%、氟哌酸0.5ug/ml~15ug/ml、青霉素25ug/ml~50ug/ml、琼脂粉1%~5%、pH=6.0~8.0. 120℃, 30min. 40~50℃, 48~72h. 生长出来的黄色的、圆形、微凸的菌落即为凝结芽孢杆菌菌落, 用于计数。

[0173] 一种权利要求1所述的生物发酵饲料的应用, 所述生物饲料可以作为混合型饲料添加剂或单胃动物配合饲料的应用。

[0174] 所述生物饲料因其含有有益菌, 可以作为微生物饲料添加剂应用于各种动物, 尤其适用于单胃动物的配合饲料应用, 按照不超过20%的添加量加入至基础日粮中, 可替代部分玉米粉、部分大豆粕及全部小麦麸, 作为配合饲料应用。

[0175] 本发明的有益效果

[0176] 1、工艺先进

[0177] (1) 本工艺可减少人力运输, 采用先进的自动化连续发酵技术, 采用多菌多功能连续生产, 改变了传统的堆制发酵法, 大大提高了生产效率, 降低成本。

[0178] (2) 实现饲料原料无毒无害化处理, 保证饲料的安全性, 实现饲料的无抗化。

[0179] (3) 污染轻, 易治理

[0180] (4) 采用全天然农作物为原料, 不使用动物源材料, 投入大规模生产具有成本优势

[0181] (5) 填补国内产品生产空白

[0182] 2、菌种纯正, 均符合饲料添加剂目录要求, 代谢产物丰富; 酶活高, 分解能力强; 抑菌活性强, 有益活菌数高, 提高了动物对粗纤维的消化、吸收和利用率。

[0183] (1) 因粗纤维的含量较高, 同时含有丰富的营养。降低饲料成本, 在未经微生物发酵降解的前提下, 木薯渣、棕榈粕可以做为饲料直接饲喂反刍动物。

[0184] 木薯渣是淀粉厂利用木薯提取淀粉后剩余的副产品, 其能量一般在2.3Mcal/kg左右, 消化能10.08MJ/kg, 代谢能9.5MJ/kg, 是一种比较廉价的能量饲料, 而价格约为玉米的60%。木薯渣还可替代部分玉米及糠麸类饲料, 木薯渣含有丰富的碳水化合物, 其中无氮浸出物达到70%左右, 尽管其中含有大量的粗纤维, 但由于粗纤维主要是由纯度比较高, 几乎没有木质素和半纤维素缠绕的纤维素组成, 所以, 相对于反刍动物来说, 消化吸收率极高, 而对于单胃动物来说, 需要进行微生物发酵降解。

[0185] 棕榈粕是棕榈仁脱壳榨油后的副产品, 形状、颜色与菜子粕相似, 气味略有巧克力气味, 棕榈仁粕视其脱壳程度和加工工艺, 品质相差很大(与棉粕工艺相似)。使用棕榈仁粕替代部分玉米, 最直接的表现是: 饲养效果不变, 但饲料成本大幅降低, 畜产品在同行中的

竞争力明显提高。而其目前比玉米每吨便宜400元左右,随着我国北方地区及华北地区的玉米价格上涨过猛,畜产品价格长期低迷,一些大中型饲料企业必须千方百计降低成本才能生存,所以,在目前的形势下,使用棕榈仁粕替代部分玉米便成了首选产品。同样由于棕榈粕粗纤维的含量20%~23%,实验结果显示,棕榈仁粕含有高达55-60%NDF的纤维含量。但是许多实验室的实验结果都没能显示出棕榈仁粕所含有的纤维中有很一部分可以提高家畜的消化,而不像其他饲料中的纤维那样转化成内部能量。所以只能用来饲喂反刍动物,但其粗纤维的组成含有木质素和半纤维素,对于反刍动物而言,也难于消化吸收,所以利用率偏低。

[0186] 因此只有通过微生物发酵,才能使粗纤维得以降解,并将其转化为动物可以消化吸收的营养物质,提高饲料的利用率。饲料适口性大大增强,可消化营养含量显著增大。通过功能微生物的发酵、降解和转化等作用,饲料原料中的粗纤维、半纤维素、木质素中的植物蛋白转化为动物蛋白,并分解成单糖,同时也使氨基酸含量增加,因而容易被畜禽的胃肠吸收利用。形成多种营养产物,提高饲料营养。功能微生物在发酵过程中形成大量的代谢产物,如蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维分解酶、B族维生素和维生素A、维生素D等,可使饲料中的各种营养成分及吸收率大大提高,这是普通饲料无法相比的。含有大量的益生菌,显著提高免疫力。发酵饲料中的功能微生物进入动物肠胃后,能够杀灭有害菌,形成优势菌群环境,增强了畜禽免疫力和抗病能力。用微生物对发酵原料进行发酵转化处理后粗纤维含量比不发酵的原材料成倍降低,粗蛋白含量比不发酵成倍提高,干物质的消化率提高40%以上,而且具有酒香气味,适口性大大增强、采食率高达98%以上,比不发酵能节约饲料30%以上。用发酵饲料喂养畜禽,饲料成本可降低40-50%,大大降低养殖成本,成倍提高养殖户的经济效益。使饲料脱毒。通过微生物自身的生命活动,使饲料内所含的有毒有害物质被降解而脱除,从而大大提高了饲料的安全性。

[0187] (2) 本发明的重点是通过六种功能菌的有机组合,分解粗纤维,在降低粗纤维含量的同时,进一步将纤维素进行降解,生成双糖、单糖;同时分解粗蛋白,生成氨基酸等。有益微生物的添加,在改善动物肠道微生态环境的同时,产生的大量的抑菌物质,抑制病原微生物的滋生繁殖,增强了动物自身的抗病性。

[0188] 木薯渣的粗纤维(6%~13%):粗纤维主要是由纯度比较高,几乎没有木质素和半纤维素缠绕的纤维素。棕榈粕的粗纤维(21%~23%):由于参杂有棕榈壳,棕榈仁粕木质素含量很高(13.6%),大量的木质素使棕榈仁粕呈纤维状和沙砾状。豆粕粉的粗纤维(3.5%~7.0%)

[0189] 第一级固体发酵中:地衣芽孢杆菌分泌木质素酶(包括漆酶和过氧化物酶、锰依赖过氧化物酶)重点降解棕榈粕中的木质素,使得被其缠绕的半纤维素和纤维素裸露出来,被纤维素酶进一步分解;黑曲霉分泌纤维素酶,重点水解纤维素,转化为甘露聚糖、葡萄糖等;

[0190] 第二级固体发酵中:产朊假丝酵母能利用木薯淀粉渣、糖蜜渣、土豆淀粉废液、木材水解液生产人禽食用蛋白,同时改变饲料的适口性,变得香甜;植物乳杆菌,是乳酸菌的一种,此菌与其他乳酸菌的区别在于此菌的活菌数比较高,能大量的产酸,使水中的PH值稳定不升高,而且其产出的酸性物质能降解重金属;由于此菌是厌氧细菌(兼性好氧),在繁殖过程中能产出特有的乳酸杆菌素,乳酸杆菌素是一种生物型的防腐剂。如果长期使用植物乳酸杆菌,就能很好的抑制底部粪便和残饵料的腐烂,也就降低了氨氮和亚硝酸盐的增加,

大量减少了化学降解素的用量,使养殖成本降低。

[0191] 第三级固体发酵中:经过前两级的固体发酵,最初底物中的粗纤维、粗蛋白被不同程度地降解为小分子的双糖、单糖、短肽、氨基酸等,在第三级固体发酵中添加的枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌均为动物肠道益生菌。凝结芽孢杆菌是唯一能够分泌乳酸的芽孢杆菌。于1992年被美国FDA公布可用于饲料安全的菌株。能够分解糖类进行同型乳酸发酵。其代谢产物包括,L-乳酸、氨基酸、维生素、蛋白酶、淀粉酶,对大肠埃希氏菌、变形杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌等常见的肠道病原菌有一定的抑制作用。更主要的是,它可以产生凝集素——一种抗菌肽物质,直接穿透细胞膜,对李斯特菌、肠球菌和小球菌均有抑制作用。且具有耐高温、耐酸、耐胆盐、耐高渗的超强的抗逆性。

[0192] 有益微生物的添加,促进动物肠道内正常有益菌群的恢复,在抑制病原菌繁殖的同时,激发动物自身免疫系统的功能,增强对病原菌的抵抗力,达到无抗化的目的。

[0193] 综上所述,本发明涉及的一种新型的发酵饲料工艺,主要包括生产用菌种的定向筛选、二级液体发酵、三级固体发酵、成品中凝结芽孢杆菌的活菌计数方法

具体实施方式

[0194] 下面结合具体实施案例对本发明做进一步说明

[0195] 实施例1

[0196] 一、活化菌种

[0197] 1、菌种(购于国家级菌种保藏中心):黑曲霉(ACCC32589)、地衣芽孢杆菌(ACCC19747)、产朊假丝酵母(ACCC20060)、枯草芽孢杆菌(CGMCC 1.934)、凝结芽孢杆菌(ACCC00399)、植物乳杆菌(ACCC03954)

[0198] 2、菌种活化用固体培养基斜面制备(重量比)

[0199] 在无菌条件下,当培养基降温至50℃左右时,分装置无菌的空试管中,每只25ml,倾斜30°放置,凝固。于37℃空白培养24h,无杂菌生长,即可使用。各菌种的斜面培养基配方如下:

[0200] (1)真菌(黑曲霉):马铃薯30%、葡萄糖20%、琼脂粉1.5%、余量为纯净水、pH=6.0。120℃,灭菌15min。

[0201] (2)酵母菌(产朊假丝酵母):麦芽汁(波美度=12)、琼脂粉1.5%。余量为纯净水。pH=5.5。120℃灭菌25min。

[0202] (3)枯草芽孢杆菌:蛋白胨5%、牛肉膏0.1%、氯化钠3.8%、琼脂粉2.5%。余量为纯净水,pH=7.5;122℃,灭菌25min。

[0203] (4)地衣芽孢杆菌:蛋白胨3.2%、牛肉膏2.31%、氯化钠3.56%、琼脂粉2.02%。余量为纯净水,pH=7.34;120℃,灭菌25min。

[0204] (5)植物乳杆菌:蛋白胨3.5%、牛肉浸粉4.3%、酵母浸粉0.5%、葡萄糖2%、磷酸氢二钾0.18%、柠檬酸氢二铵2.32%、硫酸镁0.71%、琼脂粉2.0%、吐温2.0%、余量为纯净水。pH=5.0。120℃,灭菌15min

[0205] (6)凝结芽孢杆菌:酵母膏0.2%、蛋白胨0.22%、氯化钠1.2%、琼脂粉1.8%、余量为纯净水。pH=6.23。120℃,灭菌20min

[0206] 3、菌种活化操作

[0207] (1) 在无菌条件下,将保藏的菌种制成菌悬液,接入活化用固体斜面培养基,在适宜的温度下培养

[0208] 黑曲霉:28℃~30℃,恒温培养5天,直至菌层丰厚、纯黑色,孢子率≥90%。无杂菌。

[0209] 产朊假丝酵母:25℃~27℃,恒温培养2天,直至菌苔丰厚、细腻,显微镜观察,菌体为卵圆形或圆柱形。无杂菌。

[0210] 枯草芽孢杆菌:35℃~37℃,恒温培养3天,直至菌苔丰厚,显微镜观察,中长杆,芽孢中生,菌体不膨大,芽孢率≥90%,无杂菌。

[0211] 地衣芽孢杆菌:35℃~37℃,恒温培养3天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,短杆,芽孢中生或端生,菌体膨大,芽孢率≥90%。

[0212] 植物乳杆菌:30℃~33℃,恒温培养2天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,短杆,菌体无鞭毛、无芽孢。

[0213] 凝结芽孢杆菌:37℃~40℃,恒温培养4天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,杆状,两端圆钝,菌体无鞭毛、芽孢端生。芽孢率≥90%

[0214] (2) 按照上述方法连续活化3次后,进行菌种纯化。

[0215] 三、菌种纯化及定向筛选

[0216] 1、黑曲霉:

[0217] (1) 分离平板(重量比):硫酸铵0.5%、硫酸镁0.02%、磷酸二氢钾0.2%、氯化钠4%、羧甲基纤维素钠7.5%、琼脂1.8%、余量为纯净水。pH=6.76;120℃,灭菌30min。

[0218] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的孢子洗为孢子悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0219] (3) 培养:涂布后的分离平板 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养5~7天,直至有透明水解圈长出。

[0220] (4) 挑单:按照水解圈直径与菌落直径的比值进行选取,将比值大的单菌落逐一编号后,对应传入斜面进行培养。

[0221] 2、地衣芽孢杆菌:漆酶活性及过氧化物酶活性筛选(分解木质素)方法参考:《木质素酶及其生产菌的筛选育种》基因组学与应用生物学,2009年,第28卷,第三期578-582(1)漆酶活性筛选:鞣酸平板法(PDA-bavendamm)(2)过氧化物酶活性筛选:亮蓝平板法(PDA-RB)

[0222] 3、产朊假丝酵母菌:

[0223] (1) 分离平板(重量比):葡萄糖1.7%、蛋白胨3.5%、酵母浸出粉1.5%、琼脂粉2.5%、余量为纯净水。pH=5.5。120℃,灭菌30min

[0224] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0225] (3) 培养:涂布后的分离平板 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养2~4天

[0226] (4) 挑单:正常菌落形态:乳白色、细腻、边缘整齐、中型、微凸。单菌落逐一编号后,对应传入斜面, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养2~4天进行培养。

[0227] 4、枯草芽孢杆菌:蛋白酶活性及抑菌能力筛选

[0228] (1) 分离平板:同菌种活化培养基

[0229] (2) 筛选平板:

[0230] A:蛋白酶筛选平板:在菌种活化培养基中,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积10%的无菌的浓度为15%的脱脂牛奶溶液(预先于115℃,灭菌15min)

[0231] B:抑菌物质筛选平板

[0232] 上层培养基:菌种活化培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积0.6%的琼脂粉;

[0233] 下层培养基:菌种活化培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积1.5%的琼脂粉;

[0234] 制备:在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌(埃希氏大肠杆菌)的上层培养基。凝固备用。

[0235] (3) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0236] (4) 培养:涂布后的分离平板 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养1~3天,长出单菌落。

[0237] (5) 点种选择性平板:将正常的菌落逐一编号,并用无菌牙签对应点种接入选择性A、B两种平板。于 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天。在A平板上有透明的蛋白酶水解圈产生;在B平板上有透明的抑菌圈产生。

[0238] (6) 挑单:根据蛋白水解圈与大肠杆菌抑菌圈的大小与菌落直径的比值,将分离平板中的对应单菌落接入菌种活化斜面进行培养, $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天,芽孢率 $\geq 90\%$ 。

[0239] 5、植物乳杆菌:乳酸分泌能力筛选

[0240] (1) 分离平板:活化固体培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积5.5%的碳酸钙。

[0241] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0242] (3) 培养:涂布后的分离平板 $33^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天,直至长出透明水解圈。

[0243] (4) 挑单:根据透明圈的大小与单菌落直径的比值,将单菌落逐一编号,接入活化固体斜面进行培养, $33^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天。

[0244] 5、凝结芽孢杆菌:淀粉酶活性、蛋白酶活性及抑菌物质分泌能力筛选

[0245] (1) 分离平板培养基(重量比):酵母膏3.23%、蛋白胨1.28%、氯化钠0.56%、琼脂粉2.02%、余量为纯净水。 $\text{pH}=6.65$ 。 120°C ,灭菌30min;

[0246] (2) 淀粉酶活性筛选:分离平板培养基中,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积2.0%的工业淀粉;

[0247] (3) 蛋白酶活性筛选:分离平板培养基重,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积10%的无菌的浓度为15%脱脂牛奶溶液

[0248] (4) 抗菌物质筛选

[0249] 上层培养基:分离平板培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积1.0%的琼脂粉;

[0250] 下层培养基:分离平板培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积2.5%的琼脂粉;

[0251] 在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌(埃希氏大肠杆菌)的上层培养基5ml。凝固备用。

[0252] (5)操作在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。于40℃,培养72h。用无菌的牙签,将典型的单菌落逐一点种至淀粉酶筛选平板、蛋白酶筛选平板、抑菌物质筛选平板。于45℃,培养72h。根据水解圈及抑菌圈直径与菌落直径的比值,进行取舍。选取大比值对应的单菌落,接入活化斜面进行培养。于40℃,培养72h,芽孢率 $\geq 90\%$ 。

[0253] 四、摇瓶液体菌种的制备

[0254] 在无菌条件下,用接种铲取 1cm^2 的菌苔接入下述各菌种的摇瓶液体种子培养基中,与适宜的温度下恒温振荡培养至放瓶标准。

[0255] 1、黑曲霉

[0256] (1)一级种瓶制备

[0257] 培养基(重量比):蔗糖5%、硝酸钠1%、七水硫酸镁0.83%、氯化钾0.27%、七水硫酸亚铁0.001%、磷酸氢二钾0.29%、余量为自来水、pH=5.5;

[0258] 装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量: 1cm^2 /种子瓶、培养:180rpm、28℃~30℃、43h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀。生物量=28.2%

[0259] (2)二级种瓶制备

[0260] 培养基(重量比):木薯渣7.65%、棕榈粕2.39%、葡萄糖10%、玉米粉3.2%、豆粕粉5.67%、硫酸铵0.2%、尿素0.15%、磷酸二氢钾0.17%、余量为自来水。pH=5.5。装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:10%(一级摇瓶种子液的体积:二级摇瓶种子培养基)、培养:180、28℃~30℃、27h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀。生物量=34.5%

[0261] 2、产朊假丝酵母

[0262] 培养基(重量比)葡萄糖10%、蛋白胨0.2%、酵母浸出粉0.98%、pH=5.7;

[0263] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量: 1cm^2 /种子瓶、培养:180rpm、28℃~30℃、16h、标准:菌体粗壮、卵圆形、菌型一致、着色均匀。 $OD_{600\text{nm}}=3.12$;

[0264] 3、枯草芽孢杆菌

[0265] 培养基(重量比):胰蛋白胨4.52%、酵母提取物2.35%、NaCl 3.5%、余量为自来水,pH=7.32;

[0266] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量: 1cm^2 /种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、12h~16h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状。 $OD_{600\text{nm}}=2.78$

[0267] 4、地衣芽孢杆菌

[0268] 培养基(重量比):胰蛋白胨2.98%、酵母提取物5.09%、NaCl 5.87%、余量为自来水。pH=6.79;

[0269] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量: 1cm^2 /种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、14.5h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、 $OD_{600\text{nm}}=5.12$ 。

[0270] 5、植物乳杆菌

[0271] 培养基(重量比):蛋白胨3.01%、牛肉浸粉5.08%、酵母浸粉6.00%、葡萄糖1%、

柠檬酸氢二铵1.23%、乙酸钠1.25%、硫酸镁1%、余量为自来水,pH=6.5。

[0272] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1cm²/种子瓶、培养:180rpm、33℃~35℃、37h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=5.06。

[0273] 6、凝结芽孢杆菌

[0274] 培养基(重量比):胰蛋白胨6.78%、酵母提取物1.09%、NaCl3.67%、葡萄糖3.45%、余量为自来水,pH=6.0;

[0275] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:1cm²/种子瓶、培养:180rpm、38℃~40℃、42h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=4.56。

[0276] 五、一级种罐种子液制备

[0277] 首先,在50L的一级种罐内,按照下述配方,配制一级种子罐培养基,并在罐内加入25L的地下水,于123℃,实消35min。使得消后体积为35L。降温至培养温度待接种。

[0278] 其次,在无菌条件下将符合标准的摇瓶液体种子液合并在一起,每个菌种为500ml。

[0279] 最后,在火焰的保护下,将500ml的摇瓶种子液投入对应的一级种子罐内。于适宜的条件下培养一定的时间,得一级种子罐种子液。所述各菌种的一级种子罐培养基及培养条件如下,以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指摇瓶液体种子液体积占一级种子罐消后培养基体积的百分比。“通气比”指单体积的培养基每分钟通入的无菌空气的体积。(比如1:0.5,指1升培养液中每分钟通入的无菌空气的体积为0.5升。以下同)

[0280] 1、黑曲霉

[0281] 培养基(重量比):木薯渣3.12%、棕榈粕2.5%、葡萄糖4.6%、玉米粉2.34%、豆粕粉2.56%、硫酸铵0.76%、尿素1.28%、磷酸二氢钾0.57%、余量为地下水。pH=5.5;装量:70%、灭菌:120℃~123℃,60min、接种量:1.4%、培养:28℃~30℃、48h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.5、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状、生物量=28.7%。

[0282] 2、产朊假丝酵母

[0283] 培养基(重量比):葡萄糖3.35%、蛋白胨0.43%、酵母浸出粉0.32%、余量为地下水,pH=5.0;

[0284] 装量:70%、灭菌:118℃~120℃,25min、接种量:1.4%、培养:28℃~30℃、13.5h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.5、标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀、OD_{600nm}=2.678。

[0285] 3、枯草芽孢杆菌

[0286] 培养基(重量比):葡萄糖6.15%、豆饼粉1.32%、花生饼粉3.76%、玉米粉2.98%、蛋白胨1.21%、酵母浸粉0.65%、碳酸钙2.91%、余量为地下水,pH=7.42;

[0287] 装量:70%、灭菌:123℃~125℃,30min、接种量:1.4%、培养:30℃~33℃、14.5h、

[0288] 罐压:0.04MPa、通气比:1:0.5、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=13.6%。

[0289] 4、地衣芽孢杆菌

[0290] 培养基(重量比):葡萄糖3.56%、豆饼粉2.87%、花生饼粉1.23%、玉米粉3.95%、蛋白胨1.78%、酵母浸粉2.84%、碳酸钙0.89%、余量为地下水,pH=7.35;

[0291] 装量:70%、灭菌:123℃~125℃,30min、接种量:1.4%、培养:33℃~35℃、15h、

[0292] 罐压:0.04MPa、通气比:1:0.5、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=12%。

[0293] 5、植物乳杆菌

[0294] 培养基(重量比):蛋白胨3.0%、牛肉浸粉1.5%、酵母浸粉1%、葡萄糖4%、磷酸氢二钾0.5%、柠檬酸氢二铵1.25%、余量为地下水,pH=5.0;

[0295] 装量:70%、灭菌:120℃,30min、接种量:1.4%、培养:28℃~30℃、72h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.5、标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、 $OD_{600nm}=3.654$ 。

[0296] 6、凝结芽孢杆菌

[0297] 培养基(重量比):葡萄糖3.2%、蛋白胨1.78%、酵母膏2.1%、磷酸氢二钾1.20%、余量为地下水,pH=6.5

[0298] 装量:70%、灭菌:122℃~123℃,30min、接种量:1.4%、培养:38℃~40℃、49h、

[0299] 罐压:0.04MPa、通气比:1:0.5、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、 $OD_{600nm}=4.205$ 。

[0300] 六、二级种子罐种子制备

[0301] 首先,在200L的种子罐内,按照下述配方配制二级种子培养基,加入120L的地下水,于适宜温度下进行实罐灭菌,使得消后体积为150L。降温至培养温度待接种。

[0302] 其次,二级种子罐培养基降温的同时,进行导种管路实消,125℃,60min。

[0303] 最后,待导种管路降温后,将达到标准的一级种罐种子液通过无菌的导种管路,接入二级种子罐消后培养基内。于适宜条件下培养,得二级种子罐种子液。所述各菌种的二级种子罐培养基及培养条件如下:

[0304] 以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指一级种子罐种子液体积占二级种子罐消后培养基体积的百分比。通气比,指单位时间内通过单位体积发酵液的无菌空气的体积。比如“1:0.5,指每分钟通过1升发酵液的无菌空气的体积是0.5升”

[0305] 1、黑曲霉培养基(重量比):木薯渣3.45%、棕榈粕2.22%、葡萄糖5.30%、玉米粉2.31%、豆粕粉1.56%、硫酸铵0.5%、尿素0.5%、磷酸二氢钾0.1%、余量为地下水,pH=5.0~6.0。

[0306] 装量:75%、灭菌:120℃~121℃,35min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、35h、罐压:0.03MPa、通气比:1:0.8、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状、生物量=28.8%。

[0307] 2、产朊假丝酵母培养基(重量比):葡萄糖10%、蛋白胨0.2%、酵母浸出粉0.5%、余量为地下水,pH=5.0;

[0308] 装量:75%、灭菌:115℃~116℃,25min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、16h。

[0309] 罐压:0.03MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀、 $OD_{600nm}=4.34$ 。

[0310] 3、枯草芽孢杆菌培养基(重量比):葡萄糖5.6%、豆饼粉3.8%、花生饼粉1.23%、玉米粉2.25%、蛋白胨0.18%、酵母浸粉0.23%、碳酸钙0.53%、余量为地下水,pH=6.5

[0311] 装量:75%、灭菌:123℃~124℃,40min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、13h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量

=12%。

[0312] 4、地衣芽孢杆菌培养基(重量比):木薯渣3.45%、棕榈粕2.22%、葡萄糖5.30%、玉米粉2.31%、豆粕粉1.56%、硫酸铵0.5%、尿素0.5%、磷酸二氢钾0.1%、余量为地下水, pH=5.0~6.0。

[0313] 装量:75%、灭菌:123℃~125℃, 35min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、14h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=13%。

[0314] 5、植物乳杆菌培养基(重量比):蛋白胨0.53%、牛肉浸粉1.02%、酵母浸粉3.09%、葡萄糖5.50%、磷酸氢二钾0.23%、柠檬酸氢二铵0.85%、乙酸钠0.35%、硫酸镁0.01%、硫酸锰0.001%、吐温0.35%、余量为地下水, pH=5.5;

[0315] 装量:75%、灭菌:120℃~121℃, 25min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、37h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、OD_{600nm}=2.856。

[0316] 6、凝结芽孢杆菌培养基(重量比):葡萄糖4.1%、蛋白胨0.85%、酵母膏2.34%、七水硫酸镁0.15%、磷酸氢二钾0.22%、余量为地下水, pH=6.5

[0317] 装量:75%、灭菌:120℃~121℃, 30min、接种量:23%、培养:37℃~45℃、45h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、OD_{600nm}=3.922。

[0318] 七、固体发酵

[0319] 1、固体发酵培养基:木薯渣40%、棕榈粕10%、葡萄糖6.0%、玉米粉20%、豆粕粉2.0%、硫酸铵0.1%、尿素1.2%、磷酸二氢钾0.01%、余量为地下水, pH=5.5~7.5; 121℃~125℃, 灭菌50min. 降温至35℃备用。

[0320] 2、菌种组合:指将每个菌种纯种二级液体发酵获得的第二级液体发酵液按照下述体积比混合

[0321] (1) 第一组合, 黑曲霉:地衣芽孢杆菌:=30:60

[0322] (2) 第二组合, 产朊假丝酵母:植物乳杆菌=25:25

[0323] (3) 第三组合, 枯草芽孢杆菌:凝结芽孢杆菌=30:30

[0324] 3、接种量:指组合后液体菌种的体积(L)占固体发酵培养基重量(公斤)的百分比

(1) 第一组合菌种的接种量:30%; (2) 第二组合菌种的接种量:30%; (3) 第三组合菌种的接种量:20%。

[0325] 4、接种方式与培养, 其中通气比指:每分钟单位重量的固体培养基通入的无菌空气的量。比如“1:1.2”, 指, 1公斤的固体发酵培养基, 每分钟通入的无菌空气的体积为1.2升

[0326] (1) 第一菌种组合接种与培养:当固体发酵培养基消后降温至35℃±2℃, 按照30%接种量接入第一菌种组合, 按照1:0.8的通气比进行通气搅拌培养, 进行第一级固体发酵, 按照过程检测控制发酵进程。培养时间至48h。

[0327] (2) 第二菌种组合接种与培养:当第一级固体发酵培养至发酵中期, 培养35℃±2℃时, 且还原糖的浓度≥1.5%时, 按照30%接种量接入第二菌种组合, 于35℃±2℃, 兼性厌氧继续培养, 进行第二级固体发酵, 按照过程检测控制发酵进程, 培养时间至96h。

[0328] (3) 第三菌种组合接种与培养:当第二级固体发酵培养至96h时, 且pH≤5.0时, 按照20%接种量接入第三菌种组合, 于40℃±2℃, 按照1:1的通气比进行通气搅拌继续培养,

进行第三级固体发酵,按照发酵结束终点判断标准控制发酵过程,培养时间至168h。

[0329] 5、过程检测

[0330] (1) pH:自接后每6h检测一次(酸度计);(2)还原糖:自接后每6h检测一次(DNS法)

[0331] 6、发酵结束终点判断

[0332] (1) 当pH=7.5、还原糖=0.3%时,镜检产生大量厚垣孢子和芽孢($\geq 90\%$)结束发酵。

[0333] (2) 周期:168h

[0334] 7、低温干燥:固体发酵结束后,所得发酵物经流化床低温干燥,物料温度控制在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,得成品。

[0335] 8、终产品检测项目

[0336]

检测项目	企业标准	实际检测	检测方法
粗蛋白% \geq	20	22.8	GB/T 6432-1994
粗纤维% \leq	8	6.82	GB/T 6434-2006
水分% \leq	20	13.7	兽药典
粗灰分% \leq	10	7.68	GB/T 6438-2007
赖氨酸含量% \geq	2.5	3.10	茚三酮滴定法
活菌数(亿/g干物质) \geq	50	77.2	见备注

[0337] 实施例2

[0338] 一、活化菌种

[0339] 1、菌种(购于国家级菌种保藏中心):黑曲霉(ACCC32589)、地衣芽孢杆菌(ACCC19747)、产朊假丝酵母(ACCC20060)、枯草芽孢杆菌(CGMCC 1.934)、凝结芽孢杆菌(ACCC00399)、植物乳杆菌(ACCC03954)

[0340] 2、菌种活化用固体培养基斜面制备(重量比)

[0341] 在无菌条件下,当培养基降温至 50°C 左右时,分装置无菌的空试管中,每只25ml,倾斜 30° 放置,凝固。于 37°C 空白培养24h,无杂菌生长,即可使用。各菌种的斜面培养基配方如下:

[0342] (1) 真菌(黑曲霉):马铃薯20%、葡萄糖10%、琼脂粉1.5%、余量为纯净水,pH=6.0; 120°C ,灭菌15min。

[0343] (2) 酵母菌(产朊假丝酵母):麦芽汁(波美度=10)、琼脂粉1.5%、余量为纯净水,pH=5.5; 120°C 灭菌20min。

[0344] (3) 枯草芽孢杆菌:蛋白胨2%、牛肉膏0.3%、氯化钠2.9%、琼脂粉1.5%、余量为纯净水,pH=7.5; 122°C ,灭菌25min;

[0345] (4) 地衣芽孢杆菌:蛋白胨1.0%、牛肉膏0.3%、氯化钠1.8%、琼脂粉1.5%、余量为纯净水,pH=7.00; 120°C ,灭菌25min;

[0346] (5) 植物乳杆菌:蛋白胨1.3%、牛肉浸粉0.5%、酵母浸粉1.5%、葡萄糖4%、磷酸氢二钾1.8%、柠檬酸氢二铵0.25%、硫酸镁0.71%、琼脂粉2.0%、吐温0.2%、余量为纯净水,pH=5.5; 120°C ,灭菌15min;

[0347] (6) 凝结芽孢杆菌:酵母膏2.5%、蛋白胨1.2%、氯化钠2.5%、琼脂粉1.8%、余量为纯净水,pH=6.50; 120°C ,灭菌20min;

[0348] 3、菌种活化操作

[0349] (1) 在无菌条件下,将保藏的菌种制成菌悬液,接入活化用固体斜面培养基,在适宜的温度下培养;

[0350] 黑曲霉:28℃~30℃,恒温培养6天,直至菌层丰厚、纯黑色,孢子率≥90%。无杂菌。

[0351] 酵母菌:25℃~27℃,恒温培养2天,直至菌苔丰厚、细腻,显微镜观察,菌体为卵圆形或圆柱形。无杂菌。

[0352] 枯草芽孢杆菌:35℃~37℃,恒温培养2天,直至菌苔丰厚,显微镜观察,中长杆,芽孢中生,菌体不膨大,芽孢率≥90%,无杂菌。

[0353] 地衣芽孢杆菌:35℃~37℃,恒温培养2天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,短杆,芽孢中生或端生,菌体膨大,芽孢率≥90%。

[0354] 植物乳杆菌:30℃~33℃,恒温培养1天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,短杆,菌体无鞭毛、无芽孢。

[0355] 凝结芽孢胞杆菌:37℃~40℃,恒温培养3天,直至菌苔丰厚。显微镜观察,杆状,两端圆钝,菌体无鞭毛、芽孢端生。芽孢率≥90%

[0356] (2) 按照上述方法连续活化3次后,进行菌种纯化。

[0357] 三、菌种纯化及定向筛选

[0358] 1、黑曲霉:

[0359] (1) 分离平板(重量比)硫酸铵0.1%、硫酸镁0.2%、磷酸二氢钾0.1%、氯化钠2%、羧甲基纤维素钠5%、琼脂1.5%、余量为纯净水,pH=5.05;120℃,灭菌30min。

[0360] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的孢子洗为孢子悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0361] (3) 培养:涂布后的分离平板28℃±2℃,恒温培养5~7天,直至有透明水解圈长出。

[0362] (4) 挑单:按照水解圈直径与菌落直径的比值进行选取,将比值大的单菌落逐一编号后,对应传入斜面,28℃±2℃,恒温培养5~7天。

[0363] 2、地衣芽孢杆菌:漆酶活性及过氧化物酶活性筛选(分解木质素)

[0364] 方法参考:《木质素酶及其生产菌的筛选育种》基因组学与应用生物学,2009年,第28卷,第三期578-582、(1) 漆酶活性筛选:鞣酸平板法(PDA-bavendamm)、(2) 过氧化物酶活性筛选:亮蓝平板法(PDA-RB)

[0365] 3、产朊假丝酵母菌:

[0366] (1) 分离平板(重量比):葡萄糖3.0%、蛋白胨1.5%、酵母浸出粉1.5%,琼脂粉2.5%、余量为纯净水,pH=5.0;120℃,灭菌30min

[0367] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0368] (3) 培养:涂布后的分离平板28℃±2℃,恒温培养2天;

[0369] (4) 挑单:正常菌落形态:乳白色、细腻、边缘整齐、中型、微凸。单菌落逐一编号后,对应传入斜面,28℃±2℃,恒温培养2天。

[0370] 4、枯草芽孢杆菌:蛋白酶活性及抑菌能力筛选

[0371] (1) 分离平板:同菌种活化培养基

[0372] (2) 筛选平板:

[0373] A:蛋白酶筛选平板制备:在菌种活化培养基中,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积10%的无菌的浓度为20%的脱脂牛奶(预先于115℃,灭菌15min)

[0374] B:抑菌物质筛选平板制备

[0375] 上层培养基:菌种活化培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积1.0%的琼脂粉
下层培养基:菌种活化培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积2.0%的琼脂粉

[0376] 制备:在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌(埃希氏大肠杆菌)的上层培养基。凝固备用。

[0377] (3) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0378] (4) 培养:涂布后的分离平板 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养1天,长出单菌落。

[0379] (5) 点种选择性平板:将正常的菌落逐一编号,并用无菌牙签对应点种接入选择性A、B两种平板。于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天。在A平板上有透明的蛋白酶水解圈产生;在B平板上有透明的抑菌圈产生。

[0380] (6) 挑单:根据蛋白水解圈与大肠杆菌抑菌圈的大小与菌落直径的比值,将分离平板中的对应单菌落接入菌种活化斜面进行培养, $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天,芽孢率 $\geq 90\%$ 。

[0381] 5、植物乳杆菌:乳酸分泌能力筛选

[0382] (1) 分离平板:在活化固体培养基中,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积3.5%的碳酸钙

[0383] (2) 操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。

[0384] (3) 培养:涂布后的分离平板 $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养2天,直至长出透明水解圈。

[0385] (4) 挑单:根据透明圈的大小与单菌落直径的比值,将单菌落逐一编号,接入活化固体斜面进行培养, $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养3天。

[0386] 5、凝结芽孢杆菌:淀粉酶活性、蛋白酶活性及抑菌物质分泌能力筛选

[0387] (1) 分离平板培养基(重量比)酵母膏1.9%、蛋白胨2.3%、氯化钠2.0%、琼脂粉1.8%、余量为纯净水,pH=6.00;120℃,灭菌30min

[0388] (2) 淀粉酶活性筛选:在分离平板培养基中,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积3%的工业淀粉

[0389] (3) 蛋白酶活性筛选:在分离平板培养基中加,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积10%的无菌的浓度为20%的脱脂牛奶溶液

[0390] (4) 抗菌物质筛选

[0391] 上层培养基:分离平板培养基,按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积1.0%的琼脂粉

[0392] 下层培养基:分离平板培养基按照重量体积(g/ml)比加入培养基体积2.5%的琼脂粉

[0393] 在无菌条件下,将融化并降温至40℃~50℃左右的下层培养基加入到直径为90mm

的培养皿中,每皿20ml;凝固后在上面均匀加入含有0.1%大肠杆菌(埃希氏大肠杆菌)的上层培养基。凝固备用。

[0394] (5)操作:在无菌条件下,用无菌水将活化彻底、生长丰满的菌苔洗为菌悬液,利用十倍梯度稀释法,逐步稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度各取0.1ml涂布分离平板。于37℃,培养96h。用无菌的牙签,将典型的单菌落逐一点种至淀粉酶筛选平板、蛋白酶筛选平板、抑菌物质筛选平板。于39℃,培养72h。根据水解圈及抑菌圈直径与菌落直径的比值,进行取舍。选取大比值对应的单菌落,接入活化斜面进行培养。38℃~40℃,培养72h,芽孢率 $\geq 90\%$ 。

[0395] 四、摇瓶液体菌种的制备:在无菌条件下,用接种铲取2cm²的菌苔接入下述各菌种的摇瓶液体种子培养基中,与适宜的温度下恒温振荡培养至放瓶标准。

[0396] 1、黑曲霉

[0397] (1)一级种瓶制备培养基(重量比):蔗糖2%、硝酸钠2%、七水硫酸镁1.5%、氯化钾1.0%、七水硫酸亚铁0.005%、磷酸氢二钾1.25%、余量为自来水,pH=5.0;

[0398] 装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:2cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~30℃、35h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀、生物量=29.5%。

[0399] (2)二级种瓶制备培养基(重量比):木薯渣10%、棕榈粕3.02%、葡萄糖4%、玉米粉2.5%、豆粕粉3.08%、硫酸铵0.2%、尿素0.15%、磷酸二氢钾0.17%、余量为自来水,pH=5.5。

[0400] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:15%(一级摇瓶种子液的体积:二级摇瓶种子培养基)、培养:180、28℃~30℃、30h、标准:菌丝粗壮、网状、舒展、着色均匀、生物量=35.0%。

[0401] 2、产朊假丝酵母培养基(重量比):葡萄糖8%、蛋白胨2.2%、酵母浸出粉2.00%、余量为自来水,pH=5.0;

[0402] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,20min、接种量:2cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~30℃、14h、标准:菌体粗壮、卵圆形、菌型一致、着色均匀、OD_{600nm}=2.768。

[0403] 3、枯草芽孢杆菌培养基(重量比):胰蛋白胨2.87%、酵母提取物3.00%、NaCl 5.04%、余量为自来水;pH=7.65。

[0404] 装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:2cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、15h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=3.18。

[0405] 4、地衣芽孢杆菌培养基(重量比):胰蛋白胨3.00%、酵母提取物2.00%、NaCl 3.05%、余量为自来水,pH=7.50;

[0406] 装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:2cm²/种子瓶、培养:180rpm、28℃~37℃、13h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=3.56。

[0407] 5、植物乳杆菌培养基(重量比):蛋白胨2.50%、牛肉浸粉3.00%、酵母浸粉2.50%、葡萄糖3%、柠檬酸氢二铵1.23%、乙酸钠2.25%、硫酸镁0.89%、余量为自来水,pH=6.5;

[0408] 装量:100ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:2cm²/种子瓶、培养:180rpm、33℃~35℃、25h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=6.26。

[0409] 6、凝结芽孢杆菌培养基(重量比):胰蛋白胨2.58%、酵母提取物3.00%、NaCl 2.57%、葡萄糖4.00%、余量为自来水,pH=7.00;

[0410] 装量:50ml/500ml三角瓶、灭菌:120℃,30min、接种量:1cm²/种子瓶、培养:180rpm、38℃~40℃、38h、标准:菌体粗壮、分散、舒展、着色均匀、杆状、OD_{600nm}=5.06。

[0411] 五、一级种罐种子液制备

[0412] 首先,在50L的一级种罐内,按照下述配方,配制一级种子罐培养基,并在罐内加入27L的地下水,于123℃,实消35min。使得消后体积为37L。降温至培养温度待接种。

[0413] 其次,在无菌条件下将符合标准的摇瓶液体种子液合并在一起,每个菌种为300ml。

[0414] 最后,在火焰的保护下,将300ml的摇瓶种子液投入对应的一级种子罐内。于适宜的条件下培养一定的时间,得一级种子罐种子液。所述各菌种的一级种子罐培养基及培养条件如下,以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指摇瓶液体种子液体积占一级种子罐消后培养基体积的百分比。通气比,指单位时间内通过单位体积发酵液的无菌空气的体积。比如“1:0.5,指每分钟通过1升发酵液的无菌空气的体积是0.5升”。

[0415] 1.黑曲霉培养基(重量比):木薯渣6.0%、棕榈粕2.5%、葡萄糖5.0%、玉米粉3.0%、豆粕粉2.0%、硫酸铵0.8%、尿素1.3%、磷酸二氢钾0.5%、余量为地下水,pH=5.5。

[0416] 装量:74%、灭菌:120℃~123℃,60min、接种量:0.8%、培养:28℃~30℃、40h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.8、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状、生物量=32.7%。

[0417] 2、产朊假丝酵母:培养基(重量比):葡萄糖5.0%、蛋白胨0.5%、酵母浸出粉1.5%、余量为地下水,pH=5.0;

[0418] 装量:74%、灭菌:118℃~120℃,25min、接种量:0.8%、培养:28℃~30℃、15.5h、罐压:0.02MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀、OD_{600nm}=3.125。

[0419] 3、枯草芽孢杆菌:培养基(重量比):葡萄糖4.0%、豆饼粉2.5%、花生饼粉3.0%、玉米粉3.0%、蛋白胨1.5%、酵母浸粉0.5%、碳酸钙0.5%、余量为地下水,pH=7.30;

[0420] 装量:74%、灭菌:123℃~125℃,30min、接种量:0.8%、培养:30℃~33℃、12.5h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=12.8%。

[0421] 4、地衣芽孢杆菌:培养基(重量比):葡萄糖5.0%、豆饼粉2.5%、花生饼粉2.5%、玉米粉2.5%、蛋白胨0.8%、酵母浸粉2.0%、碳酸钙1.2%、余量为地下水,pH=7.35;

[0422] 装量:74%(消后培养基的体积/空罐的体积)、灭菌:123℃~125℃,35min、接种量:0.8%、培养:33℃~35℃、15h、罐压:0.04MPa

[0423] 通气比:1:0.8标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=13.7%。

[0424] 5、植物乳杆菌培养基(重量比):蛋白胨2.0%、牛肉浸粉2.5%、酵母浸粉1.5%、葡萄糖3.5%、磷酸氢二钾0.2%、柠檬酸氢二铵1.2%、余量为地下水,pH=6.0;

[0425] 装量:74%、灭菌:120℃,30min、接种量:0.8%、培养:28℃~30℃、72h、罐压:0.03MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、OD_{600nm}=4.650。

[0426] 6、凝结芽孢杆菌培养基(重量比):葡萄糖4.0%、蛋白胨1.0%、酵母膏2.0%、磷酸

氢二钾1.5%、余量为地下水,pH=7.0;

[0427] 装量:74%、灭菌:122℃~123℃,30min、接种量:0.8%、培养:38℃~40℃、35h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.8、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、OD_{600nm}=5.006。

[0428] 六、二级种子罐种子制备

[0429] 首先,在200L的种子罐内,按照下述配方配制二级种子培养基,加入130L的地下水,于适宜温度下进行实罐灭菌,使得消后体积为160L。降温至培养温度待接种。

[0430] 其次,二级种子罐培养基降温的同时,进行导种管路实消,125℃,60min。

[0431] 最后,待导种管路降温后,将达到标准的一级种罐种子液通过无菌的导种管路,接入二级种子罐消后培养基内。于适宜条件下培养,得二级种子罐种子液。所述各菌种的二级种子罐培养基及培养条件如下:

[0432] 以下“装量”指罐内培养基的消后体积占空罐体积的百分比,“接种量”指一级种子罐种子液体积占二级种子罐消后培养基体积的百分比。通气比,指单位时间内通过单位体积发酵液的无菌空气的体积。比如“1:0.5,指每分钟通过1升发酵液的无菌空气的体积是0.5升”

[0433] 1、黑曲霉培养基(重量比):木薯渣4.0%、棕榈粕2.5%、葡萄糖4.5%、玉米粉2.5%、豆粕粉2.0%、硫酸铵0.2%、尿素0.2%、磷酸二氢钾0.3%、余量为地下水,pH=5.5;

[0434] 装量:80%、灭菌:120℃~121℃,35min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、35h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌丝粗壮、多分枝、舒展、着色均匀、网状、生物量=30.8%。

[0435] 2、产朊假丝酵母培养基(重量比):葡萄糖6.0%、蛋白胨2.0%、酵母浸出粉2.5%、余量为地下水,pH=5.0;

[0436] 装量:80%、灭菌:115℃~116℃,25min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、16h。罐压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌体粗壮、卵圆形状、色深、着色均匀、OD_{600nm}=6.30。

[0437] 3、枯草芽孢杆菌培养基(重量比):葡萄糖4.5%、豆饼粉3.0%、花生饼粉2.5%、玉米粉2.0%、蛋白胨0.2%、酵母浸粉1.5%、碳酸钙1.0%、余量为地下水,pH=7.5;

[0438] 装量:80%、灭菌:123℃~124℃,40min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、13h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=14%。

[0439] 4、地衣芽孢杆菌培养基(重量比):木薯渣4.0%、棕榈粕2.5%、葡萄糖4.5%、玉米粉2.5%、豆粕粉2.0%、硫酸铵0.2%、尿素0.2%、磷酸二氢钾0.3%、余量为地下水,pH=5.5;

[0440] 装量:80%、灭菌:123℃~125℃,35min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、14h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌体粗壮、杆状、两端整齐、大小一致、着色均匀、生物量=13%。

[0441] 5、植物乳杆菌培养基(重量比):蛋白胨2.5%、牛肉浸粉1.0%、酵母浸粉3.0%、葡萄糖5.0%、磷酸氢二钾0.2%、柠檬酸氢二铵0.8%、乙酸钠0.5%、硫酸镁0.01%、硫酸锰0.001%、余量为地下水,pH=5.5;

[0442] 装量:80%、灭菌:120℃~121℃,25min、接种量:23%、培养:28℃~30℃、37h、罐

压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌体粗壮、杆状、分散、小短杆、着色均匀、 $OD_{600nm}=3.124$ 。

[0443] 6、凝结芽孢杆菌培养基(重量比):葡萄糖4.0%、蛋白胨1.5%、酵母膏2.5%、七水硫酸镁1.2%、磷酸氢二钾0.5%、余量为地下水,pH=6.5;

[0444] 装量:80%、灭菌:120℃~121℃,30min、接种量:23%、培养:37℃~45℃、30h、罐压:0.04MPa、通气比:1:0.9、标准:菌体粗壮、杆状、两端圆钝、分散、着色均匀、 $OD_{600nm}=2.956$ 。

[0445] 七、固体发酵

[0446] 1、固体发酵培养基:木薯渣50%、棕榈粕20%、葡萄糖2.0%、玉米粉15%、豆粕粉15%、硫酸铵0.1%、尿素1.0%、磷酸二氢钾0.01%、余量为地下水,pH=6.0;121℃~125℃,灭菌60min.降温至35℃备用。

[0447] 2、菌种组合:指将每个菌种纯种二级液体发酵获得的第二级液体发酵液按照下述体积比混合:

[0448] (1) 第一组合,黑曲霉:地衣芽孢杆菌:=40:60;(2) 第二组合,产朊假丝酵母:植物乳杆菌=25:50;(3) 第三组合,枯草芽孢杆菌:凝结芽孢杆菌=50:50。

[0449] 3、接种量:指组合后液体菌种的体积占固体发酵培养基重量的百分比:(1) 第一组合菌种的接种量:20%;(2) 第二组合菌种的接种量:30%;(3) 第三组合菌种的接种量:30%。

[0450] 4、接种方式与培养,其中通气比指:每分钟1公斤的固体培养基通入的无菌空气的体积。比如“1:0.7”,指1公斤的固体发酵培养基,每分钟通入的无菌空气的体积为0.7升。

[0451] (1) 第一菌种组合接种与培养:当固体发酵培养基消后降温至33℃±2℃,按照20%接种量接入第一菌种组合,按照1:0.7的通气比进行通气搅拌,进行第一级固体发酵,按照过程检测控制发酵进程,培养至40h。

[0452] (2) 第二菌种组合接种与培养:当第一级固体发酵培养至培养40h时,且还原糖的浓度=1.55%时,按照30%接种量接入第二菌种组合,于38℃±2℃,兼性厌氧发酵,进行第二级固体发酵,按照过程检测控制发酵进程,继续培养至100h。

[0453] (3) 第三菌种组合接种与培养:当第二级固体发酵培养至100h时,且pH=5.0时,按照30%接种量接入第三菌种组合,于42℃±2℃,按照1:1.2的通气比进行通气搅拌,进行第三级固体发酵,按照发酵结束终点判断标准控制发酵过程,继续培养至160h。

[0454] 5、过程检测

[0455] (1) pH:自接后每6h检测一次(酸度计);(2) 还原糖:自接后每6h检测一次(DNS法)。

[0456] 6、发酵结束终点判断

[0457] (1) 当pH=7.9、还原糖=0.25%时,镜检产生大量厚垣孢子和芽孢(≥90%)结束发酵。(2) 周期:160h

[0458] 7、低温干燥:固体发酵结束后,所得发酵物经流化床低温干燥,控制物料的温度为35℃±2℃,得成品。

[0459] 8、终产品检测项目

[0460]

检测项目	企业标准	实际检测	检测方法
粗蛋白% \geq	20	21.5	GB/T 6432-1994
粗纤维% \leq	8	7.02	GB/T 6434-2006
水分% \leq	20	15.8	兽药典
粗灰分% \leq	10	8.85	GB/T 6438-2007
赖氨酸含量% \geq	2.5	2.78	茚三酮滴定法
活菌数(亿/g干物质) \geq	50	65.2	见备注

[0461] 备注:凝结芽孢杆菌活菌计数方法

[0462] 1. 计数平板(重量体积比)牛肉膏0.3%、蛋白胨2.3%、葡萄糖15%、氯化钠1%、溴甲酚紫5%、氟哌酸15ug/ml、青霉素50ug/ml、琼脂粉2%、pH=7.0。120℃,灭菌30min.

[0463] 2. 样品处理:精称1.000克样品,加入99ml无菌水中,于振荡器中速振摇5min。得初次菌悬液。在无菌条件下,精取初次菌悬液5ml,加入到45ml无菌水中,于振荡器中速振摇5min,得原液。利用十倍梯度稀释法将原液注意稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,分别取每个梯度稀释液0.1ml,加入到计数平板中,均匀涂布。每个梯度设三个重复。

[0464] 3. 培养:于40~50℃培养72h,生长出来的黄色的、圆形、微凸的菌落即为凝结芽孢杆菌菌落,用于计数。

[0465] 实施例4育肥猪饲喂效果试验

[0466] 1. 试验设计:采用单因子设计。试验设4个组(对照组、处理1组、处理2组、处理3组),对照组、处理1、2、3组在基础物上分别添加基础日粮重量0%、20%、35%、40%本发明上述发酵饲料。以风干物质为基础,各组饲料除粗纤维水平外,消化能、蛋白质、钙、磷等指标基本一致。

[0467] 2. 试验动物与饲料选用83.0kg左右日龄相近、健康无病同品种杜长大育肥猪60头,按照体重相近的原则随机分到4个组中,每组5个重复,每个重复3头猪。对照组饲喂玉米-麦麸-豆粕型常规日粮,处理1、2、3组分别添加20%、35%、40%的本发明饲料,配制成与对照组日粮除粗纤维水平外,能量、蛋白质、钙、磷等指标基本一致的日粮。饲料参照NRC猪饲养标准(2012)配制,具体配方及营养水平见下表。

[0468] 基础日粮组成及营养水平

[0469]

原料组成%	对照组	处理组 1	处理组 2	处理 3
玉米	73.09	66.27	57.08	52.56
小麦麸	9.00	0.00	0.00	0.00
大豆粕	14.2	10.50	4.37	3.50
本发明饲料	0.00	20.00	35.00	40.00
植物油	0.9	1.00	1.50	2.00
石粉	0.42	0.00	0.00	0.00
磷酸氢钙	0.76	0.70	0.70	0.70
L-赖氨酸盐酸盐	0.33	0.20	0.15	0.10
DL-蛋氨酸	0.19	0.12	0.10	0.05
L-苏氨酸	0.11	0.12	0.10	0.09
预混料	1.00	1.00	1.00	1.00
合计	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平				
猪消化能 (MJ/kg)	13.60	13.60		

[0470]

粗蛋白%	13.93	13.93	13.93	13.93
粗纤维 (%)	2.71	3.66	3.87	4.00
钙 (%)	0.57	0.57	0.57	0.57
总磷 (%)	0.55	0.54	0.56	0.53
赖氨酸 (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
蛋氨酸 (%)	0.34	0.34	0.34	0.34
蛋+胱氨酸 (%)	0.54	0.54	0.54	0.54
苏氨酸 (%)	0.60	0.60	0.60	0.60

[0471] 注：每千克日粮含铁50.0mg、锌50.0mg、锰30.0mg、铜3.5mg、硒0.25mg、碘0.15mg、VA 1 300IU、VD 150IU、VE 11IU、VK 30.5mg、生物素0.05mg、叶酸0.30mg、尼克酸11.0mg、泛酸7.0mg、核黄素2.0mg、VB1 1.0mg、VB61.0mg、VB12 5.0 μ g、氯化胆碱1.2g、抗氧化剂0.5g、防霉剂0.5g。

[0472] 3、饲养管理：对照组饲喂粉状全价配合饲料，处理1~3组每天将本发明的饲料与其对应的基础料混合，自由采食，自由饮水，定期驱虫，免疫。按猪场常规饲养方法进行管理。试验从83.0kg左右开始，96.5kg左右结束。

[0473] 4、生产性能测定：准确记录整个阶段的耗料量，按圈以风干基础计算平均日采食量。于试验开始、试验结束时空腹称重，计算各圈的平均日增重。根据增重和采食量计算料重比。

[0474] 试验猪的生产性能

[0475]

项目项目	对照组	处理组 1	处理组 2	处理组 3
初重 (kg)	83.0	83.1	83.0	82.9
末重 (kg)	98.6	98.09	96.6	94.0
平均日采食量 [kg/d·头]	3.22±0.28 ^a	2.90±0.27 ^a	2.95±0.27 ^a	2.52±0.21 ^b
平均日增重 (g/d)	921.9±78.7 ^a	872.6±50.1 ^a	853.5±66.1 ^a	653.3±65.4 ^b
料重比 (F/G)	3.50±0.3a ^b	3.32±0.3 ^a	3.47±0.32 ^a	3.86±0.25 ^b

[0476] 5、结论

[0477] (1) 本发明的发酵饲料—木薯渣、棕榈粕发酵饲料,在育肥猪的全价饲料的配制过程中,可以部分替代玉米、小麦麸和大豆粕。其中可以替代10%~20%的玉米,替代100%的小麦麸、替代20%~50%的大豆粕,降低生产成本约10%~30%。

[0478] (2) 在同等增重的情况下,料重比小于对照组5%,提高饲料的利用率,同时说明该饲料利于育肥猪的消化吸收。

[0479] (3) 从生产性能各项指标综合来看,添加量不超过20%的情况下,性价比最高。