



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113180149 B

(45) 授权公告日 2023.10.13

(21) 申请号 202110513260.9

CN 101273749 A, 2008.10.01

(22) 申请日 2021.05.11

CN 102687792 A, 2012.09.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103039699 A, 2013.04.17

申请公布号 CN 113180149 A

CN 1806659 A, 2006.07.26

(43) 申请公布日 2021.07.30

CN 110881569 A, 2020.03.17

(73) 专利权人 江南大学

CN 102113622 A, 2011.07.06

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

CN 110384177 A, 2019.10.29

专利权人 丹阳市金丹阳酒业有限公司

CN 102715342 A, 2012.10.10

(72) 发明人 董晋军 张兆俊 倪晔 韩瑞枝

CN 106509339 A, 2017.03.22

许国超 周婕妤 龚磊

CN 104904994 A, 2015.09.16

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权

CN 102715339 A, 2012.10.10

代理有限公司 23211

CN 106376725 A, 2017.02.08

专利代理师 林娟

CN 102160595 A, 2011.08.24

(51) Int. Cl.

CN 102599329 A, 2012.07.25

A23K 10/38 (2016.01)

CN 109251874 A, 2019.01.22

A23K 10/12 (2016.01)

CN 106561996 A, 2017.04.19

A23K 30/00 (2016.01)

CN 111011582 A, 2020.04.17

A23L 3/3571 (2006.01)

吴天祥等. 玉米酒糟乳酸菌发酵饲料培养基优化研究.《饲料研究》.2003, (第12期), 全文.

周凯等. 酒糟生产复合益生菌饲料.《山东食品发酵》.2014, (第04期), 全文. (续)

(56) 对比文件

审查员 李红卫

CN 101554202 A, 2009.10.14

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

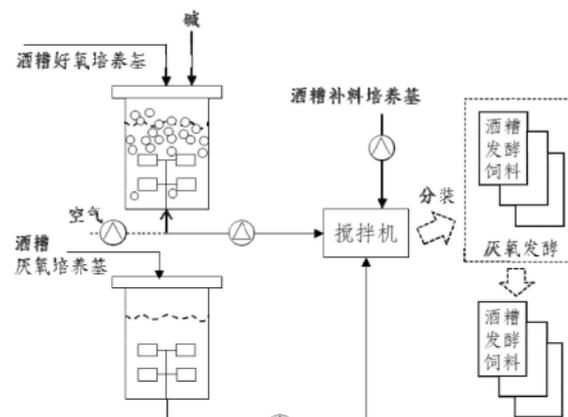
(54) 发明名称

生产效率较高, 适合大规模生产。

一种酒糟为原料连续发酵生产益生菌饲料的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种酒糟为原料连续发酵生产益生菌饲料的方法, 属于益生菌饲料食品加工技术领域。本发明充分利用了黄酒酿造产生的副产物, 先分别单独利用好养益生菌、厌氧益生菌进行连续发酵, 再混合发酵, 好养益生菌和厌氧益生菌相互协调: 厌氧菌利用好氧菌产生的淀粉酶水解酒糟中未完全利用的淀粉为小分子糖产生抑制有害微生物生长的有机酸, 好氧益生菌可以将环境中氧气消耗, 以利于厌氧微生物的生长, 抑制其他好样杂菌生长。通过连续化的操作可以生产出质量稳定的发酵饲料, 且操作简单,



CN 113180149 B

[接上页]

(56) 对比文件

郭素环等. 微生物发酵白酒糟的研究.《广东农业科学》.2012, (第08期), 全文.

孙冶等. 粪肠球菌和酿酒酵母混合益生菌发

酵条件的优化.《中国医科大学学报》.2017, (第07期), 全文.

刘桂香等. 多菌种两步法联合发酵饲料的研究.《粮食与饲料工业》.2016, (第03期), 全文.

1. 益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,以酒糟为原料,包括以下步骤:

(1) 好氧连续发酵

将好氧益生菌种子接入发酵罐中,接种量5%~10%,于25-42℃培养4-16 h,开始连续放料和补料,稀释率为 0.01 h^{-1} ~ 0.5 h^{-1} ,放料和补料速度等于稀释率乘以发酵罐体积;发酵过程中,发酵罐通气量为 $0.5\sim 3\text{ VVm}$,控制pH 3.0~8.0,第N+1级连续发酵罐的罐体积、装液量为第N级罐体积、装液量的1~10倍,第N级和N+1级发酵罐之间为串联,N的取值为1、2、3、4或5;

所述好氧益生菌为枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、酵母菌、霉菌的一种或多种;

发酵培养基是酒糟好氧培养基:酒糟10-200 g/L, K_2HPO_4 0.2-2 g/L, NaH_2PO_4 0.2-2 g/L, NaCl 0.2-10 g/L,淀粉5-30 g/L, MgCl_2 0.2-10 g/L,硫酸锰0.01-1 g/L,氯化钴0.01-1 g/L,硫酸亚铁0.01-1 g/L,硫酸锌0.01-1g/L,硫酸铵0.2-20 g/L;

补料时采用的补料培养基为酒糟好氧培养基;

(2) 厌氧连续发酵

将厌氧益生菌种子接入发酵罐中,接种量5%~10%,于25-42℃不通空气培养4-16 h,开始连续放料和补料,稀释率为 $0.01\sim 0.5\text{ h}^{-1}$,放料和补料速度为 $(0.01V\sim 0.5V)\text{ h}^{-1}$;发酵过程中搅拌转速50~150 r/min,控制pH 3.0~7.5,第N+1级连续发酵罐的罐体积、装液量为第N级罐体积、装液量的1~3倍;

所述厌氧益生菌为乳酸乳杆菌、植物乳杆菌、双歧杆菌、粪肠球菌、乳酸片球菌的一种或多种;

发酵培养基是酒糟厌氧培养基:酒糟10-200 g/L,葡萄糖 5-30 g/L, K_2HPO_4 0.2-2 g/L, NaH_2PO_4 0.2-2 g/L, NaCl 0.2-10 g/L, MgCl_2 0.2-10 g/L,硫酸锰0.01-1 g/L,氯化钴0.01-1 g/L,硫酸亚铁0.01-1 g/L,硫酸锌0.01-1g/L,碳酸钙5-20 g/L;

补料时采用的补料培养基为酒糟厌氧培养基;

(3) 混合厌氧固体发酵

酒糟补料培养基:酒糟20-90%,葡萄糖 0.5-3%, K_2HPO_4 0.02-0.2%, NaH_2PO_4 0.02-0.2%, NaCl 0.02-1%, MgCl_2 0.20-1%,硫酸锰0.001-0.1%,氯化钴0.001-0.1%,硫酸亚铁0.001-0.1%,硫酸锌0.001-0.1%,碳酸钙0.5-2%;

好氧连续发酵和厌氧连续发酵的最后一级发酵罐的出料液以1:5~5:1的体积流速比混合流入到搅拌机中并添加酒糟补料培养基,搅拌均匀后分装;酒糟补料培养基补加速度是好氧连续和厌氧连续出料液的混合总流速的2~20倍;分装好的酒糟饲料放入20~42℃厌氧环境中继续发酵1~20天后在4~20℃环境中冷藏。

2. 根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,好氧益生菌种子的制备方法是好氧益生菌接入摇瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250 r/min培养8~24 h,接入种子罐中25-42℃培养4~20 h;所述种子培养基:葡萄糖 5-30 g/L,淀粉5-30 g/L,酵母膏1-15 g/L,蛋白胨0.5-10 g/L, K_2HPO_4 0.2-2 g/L, NaH_2PO_4 0.2-2 g/L, NaCl 0.2-10 g/L。

3. 根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,厌氧益生菌种子的制备方法是厌氧益生菌接入厌氧瓶种子培养基中,于25-42℃培养箱中静止培养8~24 h,接入种子罐中25-42℃不通气培养4~20 h,所述种子培养基:葡萄糖 5-30 g/L,酵母膏

0.1-15 g/L,蛋白胨0.5-10 g/L, K_2HPO_4 0.2-2 g/L, NaH_2PO_4 0.2-2 g/L,NaCl 0.2-10 g/L。

4.根据权利要求1-3任一项所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,所述酒糟是黄酒糟、白酒糟或啤酒糟,或黄酒糟、白酒糟、啤酒糟中任意两种或三种的混合。

5.根据权利要求1-3任一项所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,连续发酵的第N+1级发酵罐补料或不补料。

6.根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,厌氧连续发酵和好氧连续发酵的流出液混合流速比为1:2~2:1。

7.根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,连续发酵是以恒定流速或不恒定流速来补料和放出放料。

8.根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,好氧发酵时,多菌种发酵,用单罐混合培养或多罐单独培养。

9.根据权利要求1所述的益生菌发酵饲料的制备方法,其特征在于,厌氧发酵时,多菌种发酵,用单罐混合培养或多罐单独培养。

10.应用权利要求1-9任一项所述方法制备得到的益生菌发酵饲料。

一种酒糟为原料连续发酵生产益生菌饲料的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及益生菌饲料食品加工技术领域,具体涉及一种酒糟为原料连续发酵生产益生菌饲料的方法。

背景技术

[0002] 酒糟作为酿造酒的副产物,酒糟产量大,含有丰富的蛋白质、氨基酸、维生素及不饱和脂肪酸、无机盐和膳食纤维等,含有丰富的营养成分,非常容易腐败,动物吃了容易生病,酒糟主要有白酒糟,黄酒糟,啤酒糟等。

[0003] 无抗饲料、无抗养殖是世界大趋势,我国已于2020年7月1日在饲料生产中全面禁抗。在抗生素禁用后,为了保证动物健康,有效减少养殖业的疾病风险,发酵饲料是较好的解决办法。发酵饲料具有促进动物健康,预防疾病的功能,可以减少或替代抗生素。

[0004] 微生物饲料益生菌是用已知的有益微生物经培养、发酵等工艺制成的对动物安全有益的活菌制剂。微生物饲料益生菌进入动物肠道后能够通过优势菌群、生物拮抗等作用改善微生态平衡,在其生长、繁殖过程中产生消化酶或其他酶、维生素、多肽、氨基酸、脂肪酸等有益于动物健康发育的营养物质,从而达到替代抗生素的目的。目前可用于饲用益生菌的微生物种类已有多种,主要包括乳酸菌、芽孢杆菌、酵母菌、放线菌和光和细菌等几大类。美国食品药品监督管理局(FDA)和美国饲料管理协会(AAFCO)于1989年公布了42种“可直接饲喂的益生菌菌种”,其中30种属于乳酸菌。我国农业部第2045号公告颁布的《饲料添加剂品种目录(2013)》中,允许使用的微生物饲料添加剂有34种,其中22种属于乳酸菌。此外,在国内外还陆续有新的菌种在饲料中研究和应用,如丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、芽孢乳杆菌(*Lactobacillus sporogens*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)等。

[0005] 目前,微生物饲料益生菌的使用方法主要有:半固体发酵法、液体发酵法和微胶囊固定法。其中微胶囊固定法是直接将益生菌加入到饲料中的方法。

[0006] 连续发酵的特点是:(1)发酵培养的菌体浓度高,菌体细胞对发酵液具有很强的适应性,细胞生长的延迟期几乎没有,发酵时间短,菌体的生产强度高,发酵产物成分较为稳定;(2)容易实现自动化、连续化操作;(3)和分批发酵相比,连续发酵不需反复洗罐、灭菌、接种等操作,因而生产效率可以大大提高。

[0007] 到目前为止工业上还没有连续发酵发生产酒糟饲料的实例。

发明内容

[0008] [技术问题]

[0009] 本发明要解决的技术问题是:酒糟难以储存容易变质腐烂的问题。

[0010] [技术方案]

[0011] 本发明提供了一种以酒糟为原料的益生菌发酵饲料及其制备方法,该益生菌发酵饲料的制备过程中充分利用了黄酒酿造产生的副产物,先分别单独利用好养益生菌、厌氧

益生菌进行连续发酵,再混合发酵,好养益生菌和厌氧益生菌相互协调:厌氧菌利用好氧菌产生的淀粉酶水解酒糟中未完全利用的淀粉为小分子糖产生抑制有害微生物生长的有机酸,好氧益生菌可以将环境中氧气消耗,以利于厌氧微生物的生长,抑制其他好样杂菌生长。通过连续化的操作可以生产出质量稳定的发酵饲料,且操作简单,生产效率较高。

[0012] 所述以酒糟为原料的益生菌发酵饲料的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1)好氧连续发酵

[0014] 将好氧益生菌种子接入发酵罐中(发酵罐体积为V),接种量5%~10%(w/w),于25-42℃培养4-16h,开始连续放料和补料,稀释率(D)为 0.01h^{-1} ~ 0.5h^{-1} ,放料和补料速度等于稀释率(D)乘以发酵罐体积(V),即 $(0.01V\sim 0.5V)\text{h}^{-1}$;发酵过程中,发酵罐通气量为 $0.5\sim 3V\text{Vm}$,用氨水或NaOH控制pH 3.0~8.0,第N+1级(N为1,2,3,4,5)连续发酵罐的罐体积装液量为第N级罐体积装液量的1~10倍,连续发酵第N级和N+1级之间为串联;

[0015] 所述好氧益生菌包括枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、酵母菌、霉菌等;所述好氧益生菌种子的制备方法是:将好氧益生菌接入摇瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250r/min培养8~24h,接入种子罐中25-42℃培养4~20h;所述种子培养基:葡萄糖5-30g/L,淀粉5-30g/L,酵母膏1-15g/L,蛋白胨0.5-10g/L, K_2HPO_4 0.2-2g/L, NaH_2PO_4 0.2-2g/L,NaCl 0.2-10g/L;

[0016] 发酵培养基是酒糟好氧培养基:酒糟10-200g/L, K_2HPO_4 0.2-2g/L, NaH_2PO_4 0.2-2g/L,NaCl 0.2-10g/L,淀粉5-30g/L, MgCl_2 0.2-10g/L,硫酸锰0.01-1g/L,氯化钴0.01-1g/L,硫酸亚铁0.01-1g/L,硫酸锌0.01-1g/L,硫酸铵0.2-20g/L;

[0017] 补料采用的补料培养基为酒糟好氧培养基。

[0018] (2)厌氧连续发酵(与好氧连续发酵同步进行)

[0019] 将厌氧益生菌种子接入发酵罐中(发酵罐体积为V),接种量5%~10%(w/w),于25-42℃不通空气培养4-16h,开始连续放料和补料,稀释率为0.01~0.5,放料和补料速度为 $(0.01V\sim 0.5V)\text{h}^{-1}$;发酵过程中搅拌转速50~150r/min,用氨水或NaOH控制pH 3.0~7.5,第二级(或第N级,N为3,4,5...)连续发酵罐的罐体积装液量为第一级罐体积装液量的1~3倍;

[0020] 所述厌氧益生菌包括:乳酸乳杆菌、植物乳杆菌、双歧杆菌、粪肠球菌、乳酸片球菌等;所述厌氧益生菌种子的制备方法是:将厌氧益生菌接入厌氧瓶种子培养基中,于25-42℃培养箱中静止培养8~24h,接入种子罐中25-42℃不通气培养4~20h,所述种子培养基:葡萄糖5-30g/L,酵母膏0.1-15g/L,蛋白胨0.5-10g/L, K_2HPO_4 0.2-2g/L, NaH_2PO_4 0.2-2g/L,NaCl 0.2-10g/L;

[0021] 发酵培养基是酒糟厌氧培养基:酒糟10-200g/L,葡萄糖5-30g/L, K_2HPO_4 0.2-2g/L, NaH_2PO_4 0.2-2g/L,NaCl 0.2-10g/L, MgCl_2 0.2-10g/L,硫酸锰0.01-1g/L,氯化钴0.01-1g/L,硫酸亚铁0.01-1g/L,硫酸锌0.01-1g/L,碳酸钙5-20g/L;

[0022] 补料采用的补料培养基为酒糟厌氧培养基。

[0023] (3)混合厌氧固体发酵

[0024] 酒糟补料培养基(w/w):酒糟20-90%,葡萄糖0.5-3%, K_2HPO_4 0.02-0.2%, NaH_2PO_4 0.02-0.2%,NaCl 0.02-1%, MgCl_2 0.20-1%,硫酸锰0.001-0.1%,氯化钴0.001-0.1%,硫酸亚铁0.001-0.1%,硫酸锌0.001-0.1%,碳酸钙0.5-2%。

[0025] 好氧连续发酵和厌氧连续发酵最后一级发酵罐的出料液以1:2~2:1的体积流速比混合流入到搅拌机中并以一定的流速添加酒糟补料培养基,搅拌均匀后分装入塑料袋中或塑料桶中;酒糟补料培养基补加速度(Kg/min)为好氧连续和厌氧连续出料液混合总流速(Kg/min)的2~20倍。分装好的酒糟饲料放入20~42℃厌氧环境中继续发酵1~20天后在4~20℃环境中冷藏,保质期1~6个月。

[0026] [有益效果]

[0027] 本发明提供一种连续化生产发酵饲料的方法,可根据需求定时定量提供新鲜的发酵饲料,解决酒糟发酵饲料的连续化生产和连续化供应的问题,避免了分批发酵大量长时间囤积导致酒糟或饲料腐烂变质。连续发酵设备利用率高,容易实现自动化操作,节约劳动力成本。

[0028] 本发明制备得到的饲料能增加动物体内益生菌含量,代替饲料中抗生素的添加。

附图说明

[0029] 图1以黄酒糟为原料单级双连续后混合厌氧固体发酵生产益生菌饲料

[0030] 图2单级双连续发酵厌氧罐和好氧罐菌体生长曲线

[0031] 图3以白酒糟为原料两级双连续后混合厌氧固体发酵生产益生菌饲料

[0032] 图4以白酒糟为原料的两级双连续发酵二级罐菌体生长曲线

[0033] 图5以白酒糟和黄酒糟为原料的三级双连续后混合厌氧固体发酵生产益生菌饲料

图6以白酒糟和黄酒糟为原料的三级双连续发酵三级罐益生菌生长曲线

具体实施方式

[0034] 实施例1

[0035] 一种以黄酒糟为原料的单级双连续发酵益生菌饲料,由如下重量份原料制成:

[0036] A. 好氧连续发酵

[0037] 菌株:枯草芽孢杆菌。

[0038] 种子培养基:葡萄糖30g/L,淀粉10g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L。

[0039] 酒糟好氧培养基:黄酒糟100g/L, K_2HPO_4 2g/L, NaH_2PO_4 1.5g/L,NaCl 5g/L,淀粉2g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.5g/L,氯化钴0.05g/L,硫酸亚铁0.05g/L,硫酸锌0.05g/L,硫酸铵5g/L。

[0040] 将枯草芽孢杆菌接入摇瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250r/min培养8~24h,按接种量5%~10% (v/v) 接入3L种子罐中25-42℃培养,种子罐装液量2L,种子罐培养4~20h后,将1.5L种子液接入20L发酵罐中25-42℃培养,发酵罐装液量15L,发酵4-16h后开始连续放料和补料,稀释率为0.1,放料和补料速度1.5L/h,种子和发酵罐通气量为0.5~3Vvm,氨水或NaOH控制pH 3.0~8.0。

[0041] B. 厌氧连续发酵

[0042] 菌株:乳酸乳杆菌和双歧杆菌。

[0043] 种子培养基:葡萄糖30g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L。

[0044] 酒糟厌氧培养基:黄酒糟100g/L,葡萄糖10g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L, $NaCl$ 5g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.1g/L,氯化钴0.1g/L,硫酸亚铁0.1g/L,硫酸锌0.05g/L,碳酸钙10g/L。

[0045] 将乳酸乳杆菌和双歧杆菌混合接入厌氧瓶种子培养基中进行混合培养,接种量5%~10% (w/w),于25-42℃培养箱中静止培养8~24h,然后接入3L种子罐中25-42℃不通气培养,种子罐装液量2L,种子罐培养4~20h后,将1.5L种子液接入发酵罐中25-42℃不通空气培养,4-16h开始连续放料和补料,稀释率为0.1,放料和补料速度1.5L/h,搅拌转速50~150r/min,碳酸钙或NaOH控制pH 3.0~7.5。单级双连续发酵厌氧罐和好氧罐菌体生长情况见图2。

[0046] C.混合厌氧固体发酵

[0047] 黄酒糟补料培养基(w/w):黄酒糟80%,葡萄糖1%, K_2HPO_4 0.1%, NaH_2PO_4 0.1%, $NaCl$ 0.5%, $MgCl_2$ 0.2%,硫酸锰0.01%,氯化钴0.001%,硫酸亚铁0.01%,硫酸锌0.005%,碳酸钙0.5%。

[0048] 好氧连续发酵和厌氧连续发酵的出料液以相同流速(1.5L/h)流入到搅拌机中并以30Kg/h的速度添加黄酒糟补料培养基(固体),搅拌均匀后分装入塑料袋中,分装好的黄酒糟饲料放入20~42℃环境中继续发酵1~20天后在4~20℃环境中贮藏,保质期1~6个月。黄酒糟为原料的单级双连续发酵益生菌示意图见图1。

[0049] 表1步骤C发酵不同时间对饲料中主要成分的影响

发酵天数 (天)	pH	多肽含量 (%)	菌体含量 (FPU/g)
0	7.5	15	1.2×10^{10}
1	6.0	16	4.2×10^{10}
2	4.2	21	2.1×10^{11}
3	4.1	24	2.8×10^{11}
4	4.0	23	2.9×10^{11}

[0051] 实施例2

[0052] 一种以白酒糟为原料的两级双连续发酵益生菌饲料,由如下重量份原料制成:

[0053] A.好氧连续发酵

[0054] 菌株:解淀粉芽孢杆菌、黑曲霉。

[0055] 种子培养基:葡萄糖30g/L,淀粉10g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L, $NaCl$ 5g/L。

[0056] 酒糟好氧培养基:白酒糟100g/L, K_2HPO_4 2g/L, NaH_2PO_4 1.5g/L, $NaCl$ 5g/L,淀粉2g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.5g/L,氯化钴0.05g/L,硫酸亚铁0.05g/L,硫酸锌0.05g/L,硫酸铵5g/L。

[0057] 将解淀粉芽孢杆菌和黑曲霉混合接入摇瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250r/min培养8~24h后接入5L种子罐中25-42℃培养,种子罐装液量3L,种子罐培养4~20h后,分别在20L一级发酵罐和50L二级发酵罐中接入1.5L种子液25-42℃培养,一级发酵罐和二级发酵罐初始装液量均为15L,一级罐发酵4-16h开始连续放料和补料,稀释率为0.2,一级罐放料和补料速度3L/h,待一级发酵罐的发酵液流入二级发酵罐15L发酵液后开始放料,

二级发酵罐装液量控制30L,放料速度为3L/h,种子和发酵罐通气量为0.5~3V_m,氨水或NaOH控制pH 3.0~8.0,一级罐和二级罐之间用泵连接,泵打料的速度可以是间歇打料也可以是连续打料。

[0058] B. 厌氧连续发酵

[0059] 菌株:植物乳杆菌、粪肠球菌。

[0060] 种子培养基:葡萄糖30g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L。

[0061] 酒糟厌氧培养基:白酒糟100g/L,葡萄糖10g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl5g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.1g/L,氯化钴0.1g/L,硫酸亚铁0.1g/L,硫酸锌0.05g/L,碳酸钙10g/L。

[0062] 将植物乳杆菌和粪肠球菌混合接入厌氧瓶种子培养基中,于25-42℃培养箱中静止培养8~24h后接入5L种子罐中25-42℃厌氧培养,种子罐装液量3L,种子罐厌氧培养4~20h后,分别在20L一级发酵罐和50L二级发酵罐中接入1.5L种子液25-42℃厌氧培养,一级发酵罐和二级发酵罐初始装液量均为15L,一级罐发酵4-16h开始连续放料和补料,稀释率为0.2,一级罐放料和补料速度3L/h,待一级发酵罐的发酵液流入二级发酵罐15L发酵液后二级发酵罐开始放料,二级发酵罐装液量控制30L,放料速度为3L/h,碳酸钙或NaOH控制种子罐和发酵罐pH 3.0~8.0,一级罐和二级罐之间用泵连接,泵打料的速度可以是间歇打料也可以是连续打料。两级双连续发酵二级罐菌体生长情况见图4。

[0063] C. 混合厌氧固体发酵

[0064] 白酒糟补料培养基(w/w):白酒糟80%,葡萄糖1%, K_2HPO_4 0.1%, NaH_2PO_4 0.1%,NaCl 0.5%, $MgCl_2$ 0.2%,硫酸锰0.01%,氯化钴0.001%,硫酸亚铁0.01%,硫酸锌0.005%,碳酸钙0.5%。

[0065] 好氧连续发酵和厌氧连续发酵的出料液以相同流速(3L/h)流入到搅拌机中并以60Kg/h的速度添加黄酒糟固体补料培养基,搅拌均匀后分装入塑料袋中,分装好的黄酒糟饲料放入20~42℃环境中继续发酵1~20天后在4~20℃环境中贮藏,保质期1~6个月。白酒糟为原料的两级双连续发酵益生菌饲料操作示意图见图3。

[0066] 表2步骤C发酵不同时间对饲料中主要成分的影响

发酵天数 (天)	pH	多肽含量 (%)	菌体含量 (FPU/g)
0	7.5	15	1.0×10^{10}
1	6.0	18	8.2×10^{10}
2	4.2	20	2.9×10^{11}
3	4.0	25	3.1×10^{11}
4	4.1	26	3.0×10^{11}

[0068] 实施例3

[0069] 一种以白酒糟和黄酒糟为原料的三级双连续补料发酵益生菌饲料,由如下重量份原料制成:

[0070] A. 好氧连续发酵

[0071] 菌株:解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌。

[0072] 种子培养基:葡萄糖30g/L,淀粉10g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L。

[0073] 酒糟好氧培养基:白酒糟50g/L,黄酒糟50g/L, K_2HPO_4 2g/L, NaH_2PO_4 1.5g/L,NaCl5g/L,淀粉2g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.5g/L,氯化钴0.05g/L,硫酸亚铁0.05g/L,硫酸锌0.05g/L,硫酸铵5g/L。

[0074] 将解淀粉芽孢杆菌和黑曲霉混合接入摇瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250r/min培养8~24h后接入5L种子罐中25-42℃培养,种子罐装液量3L,种子罐培养4~20h后,分别在20L一级发酵罐和50L二级发酵罐和100L三级发酵罐中接入1L种子液25-42℃培养,一、二、三级发酵罐初始装液量均为15L,一级罐发酵4-16h开始连续放料和补料,稀释率为0.1,一级罐放料和补料速度1.5L/h,二级发酵罐补料速度为1.5L/h,待一级发酵罐的发酵液和酒糟补料培养基流入二级发酵罐15L液体后二级发酵罐开始放料,二级发酵罐装液量控制30L,放料速度为3L/h,三级发酵罐补料速度为3L/h,待二级发酵罐的发酵液和酒糟补料培养基流入三级发酵罐45L液体后三级发酵罐开始放料,三级发酵罐装液量控制60L,放料速度为6L/h,种子和发酵罐通气量为0.5~3Vvm,氨水或NaOH控制pH 3.0~8.0,一级发酵罐、二级发酵罐和三级发酵罐之间用泵连接,泵打料的速度可以是间歇打料也可以是连续打料。

[0075] B. 厌氧连续发酵

[0076] 菌株:植物乳杆菌、丁酸梭菌。

[0077] 种子培养基:葡萄糖30g/L,酵母膏2g/L,蛋白胨5g/L, K_2HPO_4 1g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L。

[0078] 酒糟厌氧培养基:白酒糟50g/L,黄酒糟50g/L,葡萄糖10g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 1g/L,NaCl 5g/L, $MgCl_2$ 2g/L,硫酸锰0.1g/L,氯化钴0.1g/L,硫酸亚铁0.1g/L,硫酸锌0.05g/L,碳酸钙10g/L。

[0079] 将植物乳杆菌和丁酸梭菌混合接入厌氧瓶种子培养基中,于25-42℃摇床中100~250r/min培养8~24h后接入5L种子罐中25-42℃厌氧培养,种子罐装液量3L,种子罐厌氧培养4~20h后,分别在20L一级发酵罐和50L二级发酵罐和100L三级发酵罐中接入1L种子液25-42℃厌氧培养,一、二、三级发酵罐初始装液量均为15L,一级罐发酵4-16h开始连续放料和补料,稀释率为0.1,一级罐放料和补料速度1.5L/h,二级发酵罐补料速度为1.5L/h,待一级发酵罐的发酵液和酒糟补料培养基流入二级发酵罐15L液体后二级发酵罐开始放料,二级发酵罐装液量控制30L,放料速度为3L/h,三级发酵罐补料速度为3L/h,待二级发酵罐的发酵液和酒糟补料培养基流入三级发酵罐45L液体后三级发酵罐开始放料,三级发酵罐装液量控制60L,放料速度为6L/h,碳酸钙或NaOH控制pH 3.0~8.0,一级发酵罐、二级发酵罐和三级发酵罐之间用泵连接,泵打料的速度可以是间歇打料也可以是连续打料。三级双连续发酵三级罐益生菌生长情况见图6。

[0080] C. 混合厌氧固体发酵

[0081] 酒糟补料培养基(w/w):白酒糟40%,黄酒糟40%,葡萄糖1%, K_2HPO_4 0.1%, NaH_2PO_4 0.1%,NaCl 0.5%, $MgCl_2$ 0.2%,硫酸锰0.01%,氯化钴0.001%,硫酸亚铁0.01%,硫酸锌0.005%,碳酸钙0.5%。

[0082] 好氧连续发酵和厌氧连续发酵的出料液以相同流速(6L/h)流入到搅拌机中并以

120Kg/h的速度添加黄酒糟固体补料培养基,搅拌均匀后分装入塑料袋中,分装好的黄酒糟饲料放入37℃环境中继续发酵1~20天后在4~20℃环境中贮藏,保质期1~6个月。白酒糟和黄酒糟为原料的三级双连续补料发酵益生菌饲料操作示意图见图5。

[0083] 表3步骤C发酵不同时间对饲料中主要成分的影响

发酵天数(天)	pH	多肽含量(%)	菌体含量(FPU/g)
0	7.0	15	1.0×10^{10}
1	5.5	16	6.0×10^{10}
2	4.8	19	2.0×10^{11}
3	4.5	24	3.6×10^{11}
4	4.0	25	3.4×10^{11}

[0085] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

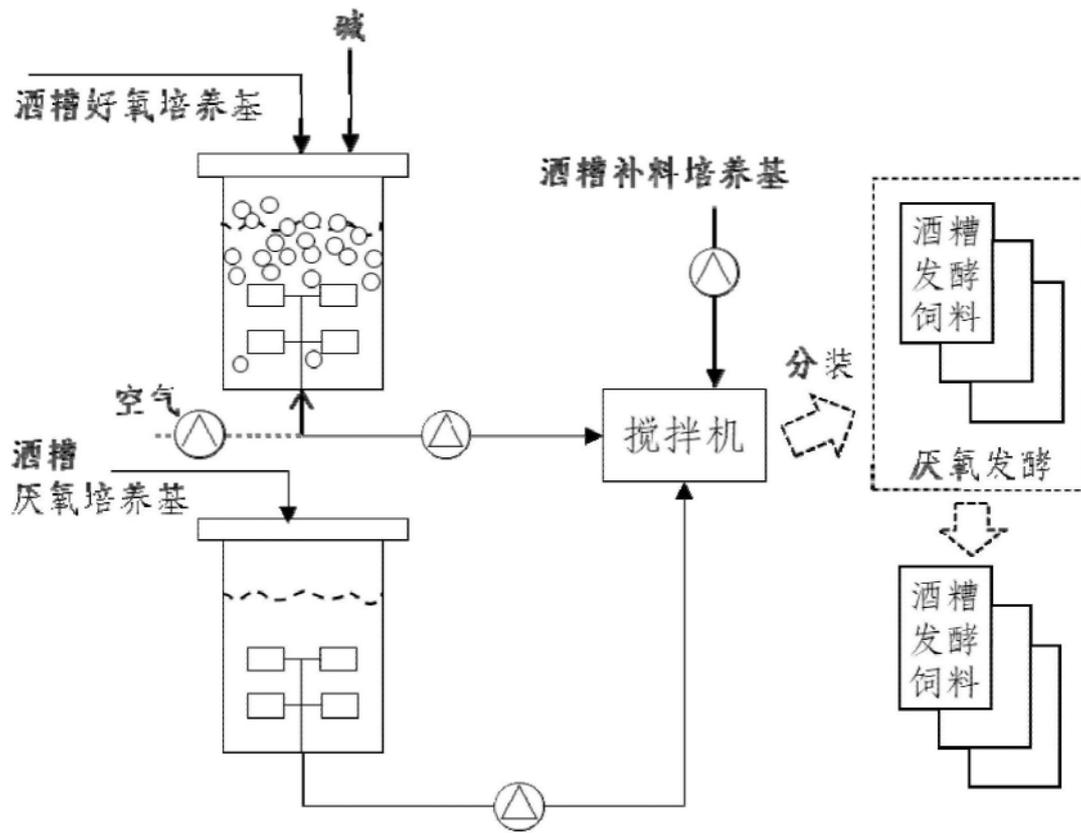


图1

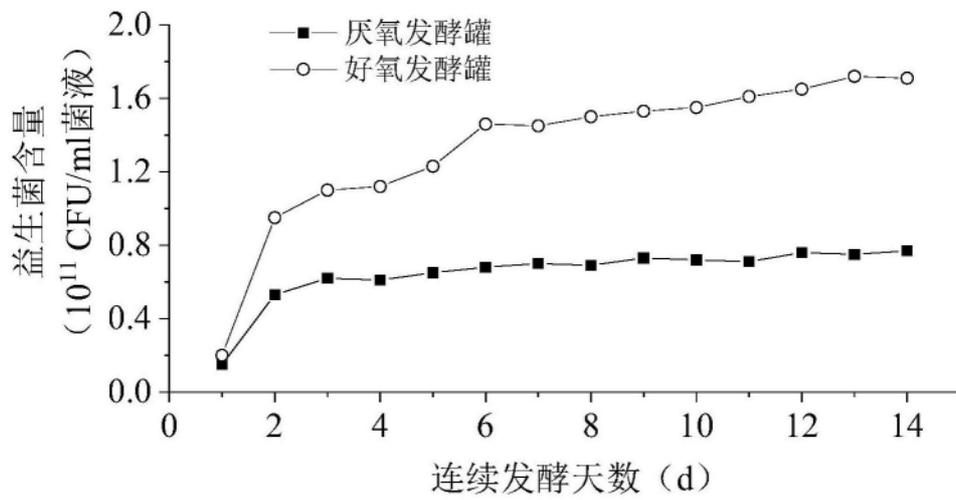


图2

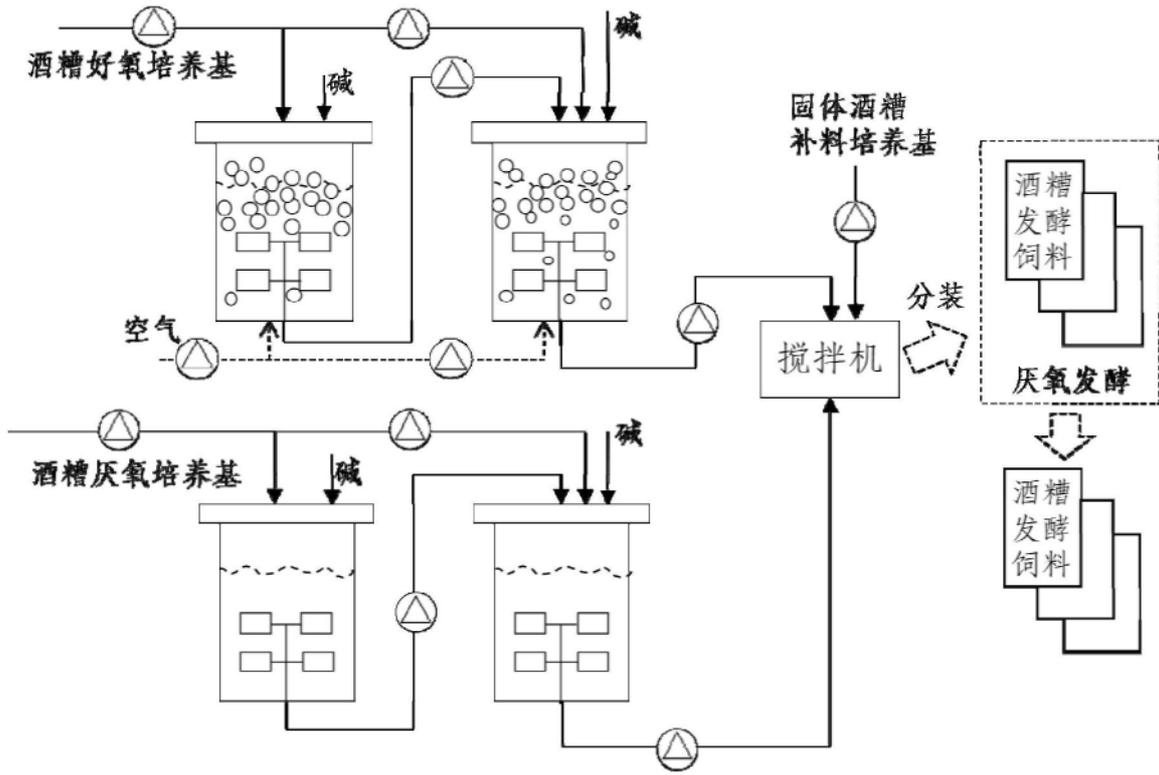


图3

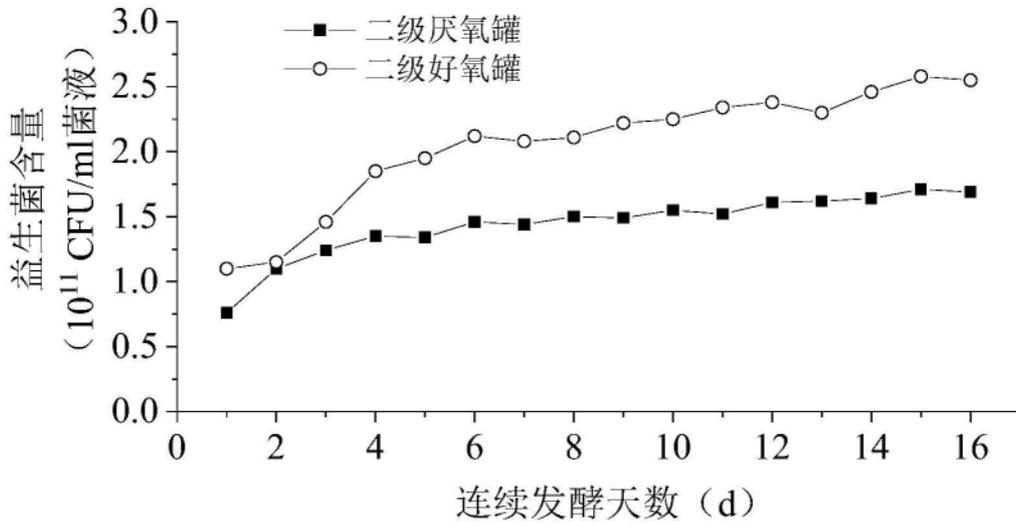


图4

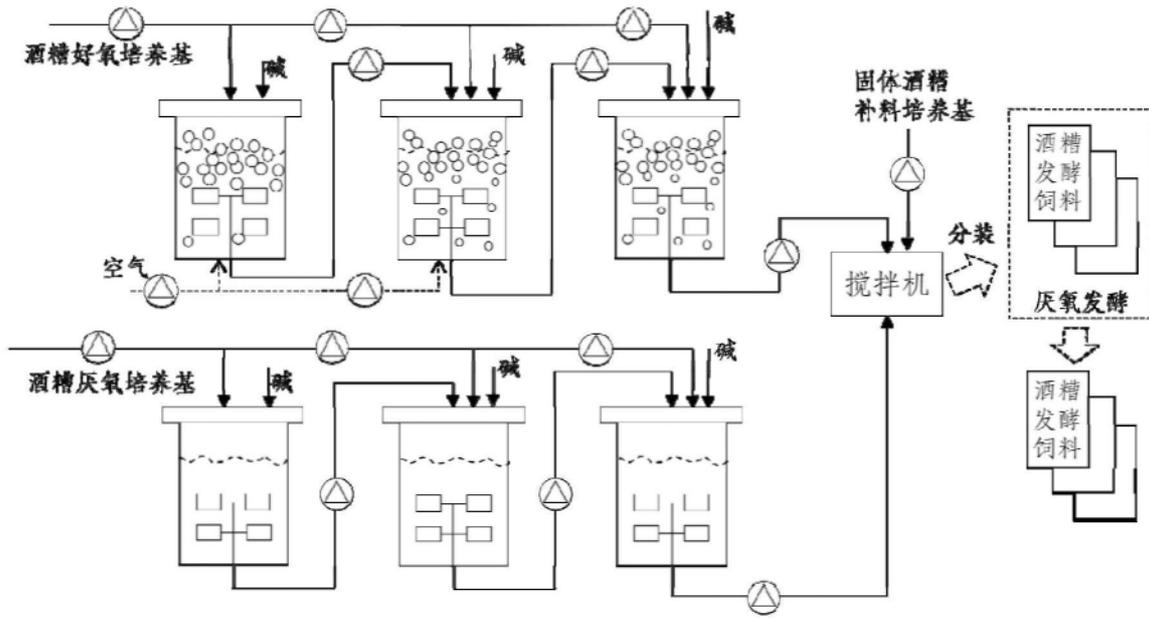


图5

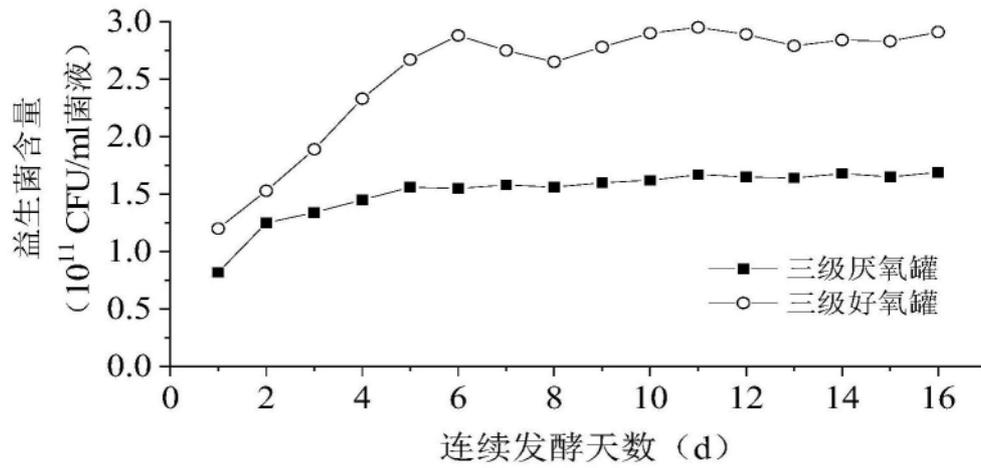


图6