



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105543131 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

---

(21) 申请号 201511021332.9 *C12R 1/25(2006.01)*  
(22) 申请日 2015.12.30 *C12R 1/125(2006.01)*  
(71) 申请人 中粮饲料有限公司 *C12R 1/10(2006.01)*  
地址 100035 北京市西城区南大安胡同6号 *C12R 1/865(2006.01)*  
四层  
申请人 中粮营养健康研究院有限公司  
(72) 发明人 雷恒 王勇生 程宗佳 陈婧  
香红星  
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
代理人 赵青朵  
(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20(2006.01)*  
*C12N 1/16(2006.01)*  
*A23K 10/37(2016.01)*  
*A23K 10/12(2016.01)*

权利要求书1页 说明书11页

---

(54) 发明名称  
复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及饲料科学技术领域,特别涉及复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法。本发明提供了一种复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法。该复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。本发明研究发现将植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母配合使用,利用该复合菌的发酵作用,可提高棉粕粗蛋白质、小分子肽的含量以及乳酸含量,经发酵后,粗蛋白质含量 $\geq 49.8\%$ ;小肽含量(占粗蛋白质) $\geq 9.0\%$ ;乳酸含量(以总酸计) $\geq 2.2\%$ 。可见,复合菌对棉粕的发酵效果显著好于各个单菌对棉粕的发酵效果。

1. 一种复合菌,其特征在於,包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

2. 根据权利要求1所述的复合菌,其特征在於,以CFU计,所述植物乳杆菌、所述枯草芽孢杆菌、所述地衣芽孢杆菌与所述酿酒酵母的用量为(1~5):(1~3):(1~3):(1~3)。

3. 根据权利要求2所述的复合菌,其特征在於,以CFU计,所述植物乳杆菌、所述枯草芽孢杆菌、所述地衣芽孢杆菌与所述酿酒酵母的用量为3:2:2:2。

4. 一种棉粕发酵饲料,其特征在於,其制备方法包括:

将棉粕与水混合,获得发酵料,将所述发酵料与复合菌混合,采用固态发酵法进行发酵,烘干,获得棉粕发酵饲料;

所述复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

5. 根据权利要求4所述的棉粕发酵饲料,其特征在於,所述水在所述发酵料中的质量百分含量为45%~65%。

6. 根据权利要求4所述的棉粕发酵饲料,其特征在於,以CFU/g计,所述复合菌与所述棉粕的用量为 $(2.5\sim 10)\times 10^8$ :1000。

7. 根据权利要求4所述的棉粕发酵饲料,其特征在於,所述固态发酵的温度为36~38℃。

8. 根据权利要求4所述的棉粕发酵饲料,其特征在於,所述固态发酵的时间为1~6d。

9. 根据权利要求4所述的棉粕发酵饲料,其特征在於,所述烘干的温度为70~90℃。

10. 一种棉粕发酵饲料的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:

将棉粕与水混合,获得发酵料,将所述发酵料与复合菌混合,采用固态发酵法进行发酵,烘干,获得棉粕发酵饲料;

所述复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

## 复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及饲料科学技术领域,特别涉及复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 随着畜牧业的快速发展,蛋白质饲料资源短缺越来越严重,如何合理开发与利用蛋白质饲料资源,将对我国畜牧业的发展起到至关重要的作用。棉粕是棉籽经过压榨后得出的面饼,再经过浸出工艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种微红或黄色的颗粒状物品,棉粕是我国的主要植物蛋白质饲料资源之一,它是制作饲料的主要原料,含有的粗蛋白可达40%以上。

[0003] 但棉粕因其含有棉酚等抗营养因子,且消化利用率低,难以大量使用。棉酚主要存在于棉仁色素腺体内,是一种不溶于水而溶于有机溶剂的黄褐色聚酚色素。在制油过程中,由于蒸炒、压榨等热作用,大部分棉酚与蛋白质、氨基酸结合而变成结合棉酚,结合棉酚在动物消化道内不被动物吸收,故毒性很小。另一部分棉酚则以游离形式存在于饼、粕及油品中,这部分游离棉酚对动物毒性较大,尤其单胃动物过量摄取或摄取时间较长,可导致生长迟缓、繁殖性能及生产性能下降,甚至导致死亡。幼小动物对棉酚的耐受能力更低。游离棉酚的中毒量与饲料中蛋白质水平、亚铁离子水平及钙离子水平有关。

[0004] 微生物固态发酵技术在饲料行业中应用较为广泛,其主要目的是通过固态发酵的方式来提高产品品质,改善适口性,降低原料中的抗营养因子含量,提高饲料的消化吸收率,使其成为天然无公害高营养的饲料产品。利用乳酸菌等微生物对棉粕进行发酵处理,通过微生物的代谢可将蛋白质大分子降解为小肽等易于吸收的小分子物质;同时发酵过程会繁殖大量的有益微生物,以及产生大量的乳酸等有机酸,降低pH,抑制有害菌的生长,且发酵产生的乳酸等有机酸使饲料具有酸香味,能改善棉粕的适口性,提高棉粕在饲料中的应用添加量。

[0005] 目前,采用单一的乳酸菌菌种发酵棉粕的发酵效果较差,急需一种发酵效果更好的发酵方法。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供了一种复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法。本发明研究发现将植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母配合使用,利用该复合菌的发酵作用,可提高棉粕粗蛋白质、小分子肽的含量以及乳酸含量,复合菌对棉粕的发酵效果显著好于各个单菌对棉粕的发酵效果。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种复合菌,包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

[0009] 植物乳杆菌是乳酸菌的一种,最适生长温度为30~35,厌氧或兼性厌氧,菌种为直或弯的杆状,单个、有时成对或成链状,最适pH6.5左右,属于同型发酵乳酸菌。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。在养殖中后期,由于动物的粪便和残饵料增加,会下沉到池塘的底部,并且腐烂,滋生很多病菌,生成大量的氨氮和亚硝酸盐,使底部偷死现象严重。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,大量减少了化工降解素的用量,使养殖成本降低。

[0010] 枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种。单个细胞 $0.7\sim 0.8\times 2\sim 3$ 微米,着色均匀。无荚膜,周生鞭毛,能运动。革兰氏阳性菌,芽孢 $0.6\sim 0.9\times 1.0\sim 1.5$ 微米,椭圆到柱状,位于菌体中央或稍偏,芽孢形成后菌体不膨大。菌落表面粗糙不透明,污白色或微黄色,在液体培养基中生长时,常形成皱褶。需氧菌。可利用蛋白质、多种糖及淀粉,分解色氨酸形成吡啶。在遗传学研究中应用广泛,对此菌的嘌呤核苷酸的合成途径与其调节机制研究较清楚。广泛分布在土壤及腐败的有机物中,易在枯草浸汁中繁殖。

[0011] 地衣芽孢杆菌细胞形态和排列呈杆状、单生,可调整菌群失调达到治疗目的,可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌。能产生抗活性物质,并具有独特的生物夺氧作用机制,能抑制致病菌的生长繁殖。

[0012] 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),又称面包酵母或出芽酵母。酿酒酵母是与人类关系最广泛的一种酵母,不仅因为传统上它用于制作面包和馒头等食品及酿酒,在现代分子和细胞生物学中用作真核模式生物,其作用相当于原核的模式生物大肠杆菌。酿酒酵母是发酵中最常用的生物种类。酿酒酵母的细胞为球形或者卵形,直径 $5\sim 10\mu\text{m}$ 。其繁殖的方法为出芽生殖。

[0013] 本发明研究发现将植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母配合使用,其对棉粕的发酵效果显著好于各个单菌对棉粕的发酵效果。

[0014] 作为优选,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $(1\sim 5):(1\sim 3):(1\sim 3):(1\sim 3)$ 。

[0015] 优选地,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $3:2:2:2$ 。

[0016] 在本发明提供的一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $1:3:1:3$ 。

[0017] 在本发明提供的另一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $5:1:3:1$ 。

[0018] 本发明还提供了一种棉粕发酵饲料,其制备方法包括:

[0019] 将棉粕与水混合,获得发酵料,将发酵料与复合菌混合,采用固态发酵法进行发酵,烘干,获得棉粕发酵饲料;

[0020] 复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

[0021] 作为优选,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $(1\sim 5):(1\sim 3):(1\sim 3):(1\sim 3)$ 。

[0022] 优选地,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $3:2:2:2$ 。

[0023] 在本发明提供的一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆

菌与酿酒酵母的用量为1:3:1:3。

[0024] 在本发明提供的另一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为5:1:3:1。

[0025] 作为优选,水在发酵料中的质量百分含量为45%~65%。

[0026] 优选地,水在发酵料中的质量百分含量为50%。

[0027] 作为优选,以CFU/g计,复合菌与棉粕的用量为 $(2.5\sim 10)\times 10^8$ :1000。

[0028] 优选地,以CFU/g计,复合菌与棉粕的用量为 $5\times 10^8$ :1000。

[0029] 作为优选,固态发酵的温度为36~38℃。

[0030] 优选地,固态发酵的温度为37℃。

[0031] 作为优选,固态发酵的时间为1~6d。

[0032] 优选地,固态发酵的时间为4d。

[0033] 作为优选,发酵采用厌氧发酵。

[0034] 作为优选,烘干的温度为70~90℃。

[0035] 优选地,烘干的温度为80℃。

[0036] 本发明还提供了一种棉粕发酵饲料的制备方法,包括如下步骤:

[0037] 将棉粕与水混合,获得发酵料,将发酵料与复合菌混合,采用固态发酵法进行发酵,烘干,获得棉粕发酵饲料;

[0038] 复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。

[0039] 作为优选,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为 $(1\sim 5):(1\sim 3):(1\sim 3):(1\sim 3)$ 。

[0040] 优选地,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为3:2:2:2。

[0041] 在本发明提供的一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为1:3:1:3。

[0042] 在本发明提供的另一些实施例中,以CFU计,植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的用量为5:1:3:1。

[0043] 作为优选,水在发酵料中的质量百分含量为45%~65%。

[0044] 优选地,水在发酵料中的质量百分含量为50%。

[0045] 作为优选,以CFU/g计,复合菌与棉粕的用量为 $(2.5\sim 10)\times 10^8$ :1000。

[0046] 优选地,以CFU/g计,复合菌与棉粕的用量为 $5\times 10^8$ :1000。

[0047] 作为优选,固态发酵的温度为36~38℃。

[0048] 优选地,固态发酵的温度为37℃。

[0049] 作为优选,固态发酵的时间为1~6d。

[0050] 优选地,固态发酵的时间为4d。

[0051] 作为优选,发酵采用厌氧发酵。

[0052] 作为优选,烘干的温度为70~90℃。

[0053] 优选地,烘干的温度为80℃。

[0054] 本发明提供了一种复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法。该复合菌包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母。本发明的有益效果为:

[0055] 本发明研究发现将植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和酿酒酵母配合使用,利用该复合菌的发酵作用,可提高棉粕粗蛋白质、小分子肽的含量以及乳酸含量,经发酵后,粗蛋白质含量 $\geq 49.8\%$ ;小肽含量(占粗蛋白质) $\geq 9.0\%$ ;乳酸含量(以总酸计) $\geq 2.2\%$ 。可见,复合菌对棉粕的发酵效果显著好于各个单菌对棉粕的发酵效果。

[0056] 复合菌发酵棉粕后pH值比单菌发酵棉粕后pH值低,易于保存。

## 具体实施方式

[0057] 本发明公开了一种复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0058] 本发明提供的复合菌、棉粕发酵饲料及其制备方法中所用菌种均可由市场购得。本发明所用复合菌种中四种菌株组成:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* ZF14)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ZF21)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* ZF23)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* ZF31),均购自定州正峰饲料销售有限公司。

[0059] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0060] 实施例1水分对棉粕发酵的影响

[0061] 1、材料与方法

[0062] 1.1、菌种

[0063] 试验所用复合菌由植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母组成,以CFU计,上述四种菌的比例为3:2:2:2。

[0064] 1.2、棉粕原料来源

[0065] 棉粕购自于中粮(昌吉)粮油工业有限公司,是棉籽经过压榨后的面饼再经浸出工艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种副产物。

[0066] 1.3、试验设计

[0067] 称取棉粕200g,按发酵料总量的45%、50%、55%、60%、65%比例添加水分,分别记为T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>。分别加入复合菌种 $1 \times 10^8$ CFU,发酵温度控制在37℃,发酵时间4d,发酵结束后80℃烘干,经粉碎后过40目筛,并测定粗蛋白质、小肽、乳酸等指标。

[0068] 1.4、化学分析

[0069] A、粗蛋白质含量检测:按GB/T 5009.5-2003规定执行。

[0070] B、小肽含量检测采用三氯乙酸提取法:准确称取发酵棉粕样品1.5g(精确到0.0001g)于100mL烧杯中,加入15%三氯乙酸溶液25mL,振荡5min,静置5min,将溶液定量转移,在3000rpm下离心10min,取全部上清液过滤,准确移取10mL滤液置于消化管中,按GB/T 5009.5-2003方法消化并测定蛋白含量。小肽计算公式如下:

[0071] 小肽(占粗蛋白质,%) $= (V - V_0) \times C \times 6.25 \times 0.014 \times 2.5 \times 100 / (M \times CP)$

[0072] 式中:V—样品消耗HCl的体积,mL;

[0073] V<sub>0</sub>—空白消耗HCl的体积,mL;

[0074] C—盐酸的摩尔浓度,mol/L;

[0075] M—样品质量,g;

[0076]  $6.25 \times 0.014$ —蛋白转换系数;

[0077] CP—发酵棉粕样品的粗蛋白质含量。

[0078] C、乳酸含量(以总酸计)采用NaOH滴定法测定:称取0.5g发酵棉粕样品(准确到0.0002g)于250mL锥形瓶中,加入100mL蒸馏水,60℃水浴30min,取40mL上清液,加入2~3滴酚酞指示剂,用标准NaOH溶液滴定至粉红色,30s不褪色。

[0079] 乳酸(以总酸计,%) =  $(V - V_0) \times C \times 0.09008 \times 100 / (M \times 40 / 100)$

[0080] 式中:V—样品消耗NaOH的体积,mL;

[0081]  $V_0$ —空白消耗NaOH的体积,mL;

[0082] 0.09008—每毫克当量NaOH相当于乳酸的克数;

[0083] M—样品质量,g。

[0084] pH测定:称取5g发酵棉粕样品置于100mL三角瓶中,加入45mL蒸馏水,摇匀后静置30min,用电极测定pH。

[0085] 1.5、数据处理

[0086] 数据采用SPSS16.0软件进行单因素方差分析,采用Duncan法进行多重比较。测定结果以“平均值±标准差”表示。

[0087] 2、结果与分析

[0088] 表1棉粕原料的化学成分及水分添加量对棉粕发酵的影响

[0089]

组别	粗蛋白质(%)	小肽(占粗蛋白质,%)	乳酸(以总酸计,%)	pH
原料	49.32±0.25 <sup>c</sup>	5.00±0.31 <sup>d</sup>	1.24±0.13 <sup>e</sup>	6.35
T <sub>1</sub>	51.07±0.47 <sup>ab</sup>	15.23±0.47 <sup>c</sup>	3.60±0.02 <sup>b</sup>	5.40
T <sub>2</sub>	51.68±0.26 <sup>a</sup>	16.27±0.13 <sup>a</sup>	3.67±0.04 <sup>a</sup>	5.34
T <sub>3</sub>	50.46±0.12 <sup>b</sup>	15.34±0.40 <sup>bc</sup>	3.54±0.03 <sup>c</sup>	5.47
T <sub>4</sub>	50.60±0.23 <sup>b</sup>	15.65±0.42 <sup>b</sup>	3.58±0.02 <sup>bc</sup>	5.43
T <sub>5</sub>	50.35±0.38 <sup>b</sup>	15.82±0.24 <sup>b</sup>	3.21±0.05 <sup>d</sup>	5.71

[0090] 注:同列肩标不同表示差异显著( $p < 0.05$ )

[0091] 由表1可知,棉粕发酵后,所有发酵组的粗蛋白质、小肽及乳酸含量均比未发酵棉粕显著提高( $P < 0.05$ ),而pH明显降低。其中T<sub>2</sub>组(即发酵培养基中添加50%的水分)的粗蛋白质含量达到51.68%,显著高于T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>三组,略高于T<sub>1</sub>组;小肽含量高达16.27%(占粗蛋白质),显著高于T<sub>1</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>四组;乳酸含量达到3.67,显著高于T<sub>1</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>四组。综合各指标比较,发现T<sub>2</sub>组发酵效果优于其他五组,即添加50%的水分对棉粕的发酵效果最好。

[0092] 实施例2发酵时间对棉粕发酵的影响

[0093] 1、材料与方法

[0094] 1.1、菌种

[0095] 试验所用复合菌由植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母组成,上述四种菌的比例为3:2:2:2。

[0096] 1.2、棉粕原料来源

[0097] 棉粕购自于中粮(昌吉)粮油工业有限公司,是棉籽经过压榨后的面饼再经浸出工

艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种副产物。

[0098] 1.3、试验设计

[0099] 称取棉粕200g,根据实施例1的方法,调整发酵原料中水分为50%,发酵温度控制在37℃,发酵时间分别为1d、2d、3d、4d、5d、6d,发酵结束后80℃烘干,经粉碎后过40目筛,并测定粗蛋白质、小肽、乳酸等指标。

[0100] 1.4、化学分析

[0101] A、粗蛋白质含量检测:按GB/T 5009.5-2003规定执行。

[0102] B、小肽含量检测采用三氯乙酸提取法:准确称取发酵棉粕样品1.5g(精确到0.0001g)于100mL烧杯中,加入15%三氯乙酸溶液25mL,振荡5min,静置5min,将溶液定量转移,在3000rpm下离心10min,取全部上清液过滤,准确移取10mL滤液置于消化管中,按GB/T 5009.5-2003方法消化并测定蛋白含量。小肽计算公式如下:

[0103] 小肽(占粗蛋白质,%) =  $(V - V_0) \times C \times 6.25 \times 0.014 \times 2.5 \times 100 / (M \times CP)$

[0104] 式中:V—样品消耗HCl的体积,mL;

[0105]  $V_0$ —空白消耗HCl的体积,mL;

[0106] C—盐酸的摩尔浓度,mol/L;

[0107] M—样品质量,g;

[0108]  $6.25 \times 0.014$ —蛋白转换系数;

[0109] CP—发酵棉粕样品的粗蛋白质含量。

[0110] C、乳酸含量(以总酸计)采用NaOH滴定法测定:称取0.5g发酵棉粕样品(精确到0.0002g)于250mL锥形瓶中,加入100mL蒸馏水,60℃水浴30min,取40mL上清液,加入2~3滴酚酞指示剂,用标准NaOH溶液滴定至粉红色,30s不褪色。

[0111] 乳酸(以总酸计,%) =  $(V - V_0) \times C \times 0.09008 \times 100 / (M \times 40 / 100)$

[0112] 式中:V—样品消耗NaOH的体积,mL;

[0113]  $V_0$ —空白消耗NaOH的体积,mL;

[0114] 0.09008—每毫克当量NaOH相当于乳酸的克数;

[0115] M—样品质量,g。

[0116] pH测定:称取5g发酵棉粕样品置于100mL三角瓶中,加入45mL蒸馏水,摇匀后静置30min,用电极测定pH。

[0117] 1.5、数据处理

[0118] 数据采用SPSS16.0软件进行单因素方差分析,采用Duncan法进行多重比较。测定结果以“平均值±标准差”表示。

[0119] 2、结果与分析

[0120] 表2不同发酵时间对棉粕发酵的影响

[0121]



发酵时间 (d)	粗蛋白质(%)	小肽(占粗蛋白质, %)	乳酸(以总酸计, %)	pH
1	49.85±0.16 <sup>d</sup>	9.02±0.24 <sup>e</sup>	2.27±0.03 <sup>f</sup>	6.09
2	50.66±0.35 <sup>c</sup>	12.58±0.49 <sup>d</sup>	2.96±0.03 <sup>e</sup>	5.78
3	51.08±0.42 <sup>bc</sup>	14.76±0.42 <sup>c</sup>	3.43±0.02 <sup>d</sup>	5.51
4	51.75±0.30 <sup>ab</sup>	16.19±0.47 <sup>b</sup>	3.64±0.04 <sup>c</sup>	5.33
5	51.83±0.21 <sup>a</sup>	16.80±0.31 <sup>ab</sup>	3.78±0.03 <sup>b</sup>	5.28
6	51.88±0.26 <sup>a</sup>	16.97±0.36 <sup>a</sup>	3.91±0.04 <sup>a</sup>	5.23

[0122] 由表2可知,随着发酵时间的延长,发酵棉粕的粗蛋白质、小肽及乳酸含量均逐步增加,pH逐步降低,发酵4d后,增长趋势较为平缓,继续延长发酵时间至5d或6d,粗蛋白质含量没有显著增加。考虑到发酵周期延长会增加生产成本等问题,优选发酵时间为4d。

[0123] 实施例3单菌与复合菌发酵对比试验

[0124] 1、材料与方法

[0125] 1.1、菌种

[0126] 单菌发酵试验采用菌种分别为植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌,经液体培养基培养后,所得菌种浓度为 $0.5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL;复合菌发酵试验所用复合菌由植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母组成,四种菌的比例为3:2:2:2。

[0127] 1.2、棉粕原料来源

[0128] 棉粕购自于中粮(昌吉)粮油工业有限公司,是棉籽经过压榨后的面饼再经浸出工艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种副产物。

[0129] 1.3、试验设计

[0130] 称取棉粕200g,根据实施例1的方法,调整发酵原料中水分为50%,单菌或复合菌种加入量为 $1 \times 10^8$ CFU,发酵温度控制在37℃,发酵时间为4d,发酵结束后80℃烘干,经粉碎后过40目筛,并测定粗蛋白质、小肽、乳酸等指标。

[0131] 1.4、化学分析

[0132] A、粗蛋白质含量检测:按GB/T 5009.5-2003规定执行。

[0133] B、小肽含量检测采用三氯乙酸提取法:准确称取发酵棉粕样品1.5g(精确到0.0001g)于100mL烧杯中,加入15%三氯乙酸溶液25mL,振荡5min,静置5min,将溶液定量转移,在3000rpm下离心10min,取全部上清液过滤,准确移取10mL滤液置于消化管中,按GB/T 5009.5-2003方法消化并测定蛋白含量。小肽计算公式如下:

[0134] 小肽(占粗蛋白质,%) =  $(V - V_0) \times C \times 6.25 \times 0.014 \times 2.5 \times 100 / (M \times CP)$

[0135] 式中:V—样品消耗HCl的体积,mL;

[0136]  $V_0$ —空白消耗HCl的体积,mL;

[0137] C—盐酸的摩尔浓度,mo1/L;

[0138] M—样品质量,g;

- [0139]  $6.25 \times 0.014$ —蛋白转换系数；
- [0140] CP—发酵棉粕样品的粗蛋白质含量。
- [0141] C、乳酸含量(以总酸计)采用NaOH滴定法测定：称取0.5g发酵棉粕样品(准确到0.0002g)于250mL锥形瓶中，加入100mL蒸馏水，60℃水浴30min，取40mL上清液，加入2~3滴酚酞指示剂，用标准NaOH溶液滴定至粉红色，30s不褪色。
- [0142] 乳酸(以总酸计，%) =  $(V - V_0) \times C \times 0.09008 \times 100 / (M \times 40 / 100)$
- [0143] 式中：V—样品消耗NaOH的体积，mL；
- [0144]  $V_0$ —空白消耗NaOH的体积，mL；
- [0145] 0.09008—每毫克当量NaOH相当于乳酸的克数；
- [0146] M—样品质量，g。
- [0147] pH测定：称取5g发酵棉粕样品置于100mL三角瓶中，加入45mL蒸馏水，摇匀后静置30min，用电极测定pH。
- [0148] 1.5、数据处理
- [0149] 数据采用SPSS16.0软件进行单因素方差分析，采用Duncan法进行多重比较。测定结果以“平均值±标准差”表示。
- [0150] 2、结果与分析
- [0151] 表3单菌与复合菌对棉粕发酵的影响
- [0152]

菌种	粗蛋白质 (%)	小肽(占粗蛋白质，%)	乳酸(以总酸计，%)	pH
植物乳杆菌	49.67±0.28 <sup>c</sup>	8.47±0.33 <sup>d</sup>	2.91±0.02 <sup>b</sup>	5.73
酿酒酵母	50.38±0.12 <sup>b</sup>	9.22±0.40 <sup>c</sup>	1.18±0.01 <sup>c</sup>	6.24
枯草芽孢杆菌	50.23±0.24 <sup>b</sup>	10.74±0.17 <sup>b</sup>	1.13±0.03 <sup>d</sup>	6.13
地衣芽孢杆菌	50.16±0.35 <sup>b</sup>	10.83±0.12 <sup>b</sup>	1.12±0.02 <sup>d</sup>	6.15
复合菌	51.62±0.23 <sup>a</sup>	15.93±0.26 <sup>a</sup>	3.58±0.04 <sup>a</sup>	5.32

[0153] 由表3可知，复合菌发酵棉粕的粗蛋白质、小肽(占粗蛋白质，%)以及乳酸含量均显著高于植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌单独发酵的棉粕，且pH值比单菌发酵棉粕低，易于保存。

[0154] 实施例4单菌与复合菌发酵对比试验

[0155] 1、材料与方法

[0156] 1.1、菌种

[0157] 单菌发酵试验采用菌种分别为植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌，经液体培养基培养后，所得菌种浓度为 $0.5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL；复合菌发酵试验所用复合菌由植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母组成，四种菌的比例为1:3:1:3。

[0158] 1.2、棉粕原料来源

[0159] 棉粕购自于中粮(昌吉)粮油工业有限公司，是棉籽经过压榨后的面饼再经浸出工

艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种副产物。

### [0160] 1.3、试验设计

[0161] 称取棉粕200g,根据实施例1的方法,调整发酵原料中水分为50%,单菌或复合菌种加入量为 $1 \times 10^8$ CFU,发酵温度控制在37℃,发酵时间为4d,发酵结束后80℃烘干,经粉碎后过40目筛,并测定粗蛋白质、小肽、乳酸等指标。

### [0162] 1.4、化学分析

[0163] A、粗蛋白质含量检测:按GB/T 5009.5-2003规定执行。

[0164] B、小肽含量检测采用三氯乙酸提取法:准确称取发酵棉粕样品1.5g(精确到0.0001g)于100mL烧杯中,加入15%三氯乙酸溶液25mL,振荡5min,静置5min,将溶液定量转移,在3000rpm下离心10min,取全部上清液过滤,准确移取10mL滤液置于消化管中,按GB/T 5009.5-2003方法消化并测定蛋白含量。小肽计算公式如下:

[0165] 小肽(占粗蛋白质,%) =  $(V - V_0) \times C \times 6.25 \times 0.014 \times 2.5 \times 100 / (M \times CP)$

[0166] 式中:V—样品消耗HCl的体积,mL;

[0167]  $V_0$ —空白消耗HCl的体积,mL;

[0168] C—盐酸的摩尔浓度,mol/L;

[0169] M—样品质量,g;

[0170]  $6.25 \times 0.014$ —蛋白转换系数;

[0171] CP—发酵棉粕样品的粗蛋白质含量。

[0172] C、乳酸含量(以总酸计)采用NaOH滴定法测定:称取0.5g发酵棉粕样品(精确到0.0002g)于250mL锥形瓶中,加入100mL蒸馏水,60℃水浴30min,取40mL上清液,加入2~3滴酚酞指示剂,用标准NaOH溶液滴定至粉红色,30s不褪色。

[0173] 乳酸(以总酸计,%) =  $(V - V_0) \times C \times 0.09008 \times 100 / (M \times 40 / 100)$

[0174] 式中:V—样品消耗NaOH的体积,mL;

[0175]  $V_0$ —空白消耗NaOH的体积,mL;

[0176] 0.09008—每毫克当量NaOH相当于乳酸的克数;

[0177] M—样品质量,g。

[0178] pH测定:称取5g发酵棉粕样品置于100mL三角瓶中,加入45mL蒸馏水,摇匀后静置30min,用电极测定pH。

### [0179] 1.5、数据处理

[0180] 数据采用SPSS16.0软件进行单因素方差分析,采用Duncan法进行多重比较。测定结果以“平均值±标准差”表示。

## [0181] 2、结果与分析

[0182] 表4单菌与复合菌对棉粕发酵的影响

[0183]

菌种	粗蛋白质 (%)	小肽(占粗蛋白质, %)	乳酸(以总酸计, %)	pH
植物乳杆菌	49.67±0.28 <sup>c</sup>	8.47±0.33 <sup>d</sup>	2.91±0.02 <sup>b</sup>	5.73
酿酒酵母	50.38±0.12 <sup>b</sup>	9.22±0.40 <sup>c</sup>	1.18±0.01 <sup>c</sup>	6.24
枯草芽孢杆菌	50.23±0.24 <sup>b</sup>	10.74±0.17 <sup>b</sup>	1.13±0.03 <sup>d</sup>	6.13
地衣芽孢杆菌	50.16±0.35 <sup>b</sup>	10.83±0.12 <sup>b</sup>	1.12±0.02 <sup>d</sup>	6.15
复合菌	50.98±0.12 <sup>a</sup>	14.22±0.30 <sup>a</sup>	3.18±0.02 <sup>a</sup>	5.62

[0184] 由表4可知,复合菌发酵棉粕的粗蛋白质、小肽(占粗蛋白质,%)以及乳酸含量均显著高于植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌单独发酵的棉粕,且pH值比单菌发酵棉粕低,易于保存。

[0185] 实施例5单菌与复合菌发酵对比试验

[0186] 1、材料与方法

[0187] 1.1、菌种

[0188] 单菌发酵试验采用菌种分别为植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌,经液体培养基培养后,所得菌种浓度为 $0.5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL;复合菌发酵试验所用复合菌由植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母组成,四种菌的比例为5:1:3:1。

[0189] 1.2、棉粕原料来源

[0190] 棉粕购自于中粮(昌吉)粮油工业有限公司,是棉籽经过压榨后的面饼再经浸出工艺将里面的大部分残油分离出来,得到的一种副产物。

[0191] 1.3、试验设计

[0192] 称取棉粕200g,根据实施例1的方法,调整发酵原料中水分为50%,单菌或复合菌种加入量为 $1 \times 10^8$ CFU,发酵温度控制在37℃,发酵时间为4d,发酵结束后80℃烘干,经粉碎后过40目筛,并测定粗蛋白质、小肽、乳酸等指标。

[0193] 1.4、化学分析

[0194] A、粗蛋白质含量检测:按GB/T 5009.5-2003规定执行。

[0195] B、小肽含量检测采用三氯乙酸提取法:准确称取发酵棉粕样品1.5g(精确到0.0001g)于100mL烧杯中,加入15%三氯乙酸溶液25mL,振荡5min,静置5min,将溶液定量转移,在3000rpm下离心10min,取全部上清液过滤,准确移取10mL滤液置于消化管中,按GB/T 5009.5-2003方法消化并测定蛋白含量。小肽计算公式如下:

[0196] 小肽(占粗蛋白质,%) =  $(V - V_0) \times C \times 6.25 \times 0.014 \times 2.5 \times 100 / (M \times CP)$

[0197] 式中:V—样品消耗HCl的体积,mL;

[0198]  $V_0$ —空白消耗HCl的体积,mL;

[0199] C—盐酸的摩尔浓度, mol/L;

[0200] M—样品质量,g;

[0201]  $6.25 \times 0.014$ —蛋白转换系数;

[0202] CP—发酵棉粕样品的粗蛋白质含量。

[0203] C、乳酸含量(以总酸计)采用NaOH滴定法测定:称取0.5g发酵棉粕样品(准确到0.0002g)于250mL锥形瓶中,加入100mL蒸馏水,60℃水浴30min,取40mL上清液,加入2~3滴酚酞指示剂,用标准NaOH溶液滴定至粉红色,30s不褪色。

[0204] 乳酸(以总酸计,%) $= (V-V_0) \times C \times 0.09008 \times 100 / (M \times 40 / 100)$

[0205] 式中:V—样品消耗NaOH的体积,mL;

[0206]  $V_0$ —空白消耗NaOH的体积,mL;

[0207] 0.09008—每毫克当量NaOH相当于乳酸的克数;

[0208] M—样品质量,g。

[0209] pH测定:称取5g发酵棉粕样品置于100mL三角瓶中,加入45mL蒸馏水,摇匀后静置30min,用电极测定pH。

[0210] 1.5、数据处理

[0211] 数据采用SPSS16.0软件进行单因素方差分析,采用Duncan法进行多重比较。测定结果以“平均值±标准差”表示。

[0212] 2、结果与分析

[0213] 表5单菌与复合菌对棉粕发酵的影响

[0214]

菌种	粗蛋白质 (%)	小肽(占粗蛋白质,%)	乳酸(以总酸计,%)	pH
植物乳杆菌	49.67±0.28 <sup>c</sup>	8.47±0.33 <sup>d</sup>	2.91±0.02 <sup>b</sup>	5.73
酿酒酵母	50.38±0.12 <sup>b</sup>	9.22±0.40 <sup>c</sup>	1.18±0.01 <sup>c</sup>	6.24
枯草芽孢杆菌	50.23±0.24 <sup>b</sup>	10.74±0.17 <sup>b</sup>	1.13±0.03 <sup>d</sup>	6.13
地衣芽孢杆菌	50.16±0.35 <sup>b</sup>	10.83±0.12 <sup>b</sup>	1.12±0.02 <sup>d</sup>	6.15
复合菌	51.23±0.24 <sup>a</sup>	14.74±0.17 <sup>a</sup>	3.43±0.04 <sup>a</sup>	5.42

[0215] 由表5可知,复合菌发酵棉粕的粗蛋白质、小肽(占粗蛋白质,%)以及乳酸含量均显著高于植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌单独发酵的棉粕,且pH值比单菌发酵棉粕低,易于保存。

[0216] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。