



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103734480 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201310717037. 1

*C12N 9/16* (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 23

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M2013541 2013. 11. 03

(71) 申请人 湖南鸿鹰生物科技有限公司

地址 415400 湖南省常德市津市市嘉山工业  
新区

(72) 发明人 李海清 张锦杰 朱永明 易继云  
刘文明

(51) Int. Cl.

*A23K 1/165* (2006. 01)

*A23K 1/16* (2006. 01)

*C12N 9/42* (2006. 01)

*C12N 9/24* (2006. 01)

权利要求书4页 说明书14页

(54) 发明名称

一种可提高动物食欲的饲料复配酶及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种可提高动物食欲的饲料复配酶及其制备方法,属于酶制剂制备技术领域。饲料复配酶由香味麦芽酶、饲用复合酶、酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶、中草药提取物、保护剂、激活剂科学复配而成,饲用复合酶中含有蛋白酶、甘露聚糖酶、 $\alpha$ -半乳糖酶和果胶酶多种酶活力且热稳定性和 pH 稳定性强。制得的饲料复配酶为畜禽提供了安全消化酶,有效减轻了消化负担,提高了原料利用率和生长率,保护了环境,且给饲料带来愉悦的天然麦芽香味,增加畜禽食欲,同时适量的激活剂可在同等条件下充分发挥酶制剂的效力,节约酶制剂添加量,中草药提取物既延长复合酶制剂的保质期又提高了畜禽的免疫力,达到了一酶多用的效果。

1. 一种可提高动物食欲的饲料复配酶,由以下重量份数的酶制剂组成:香味麦芽酶 30-40 份,饲用复合酶 30-50 份,酸性木聚糖酶 20-30 份,纤维素酶 20-30 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15-20 份,淀粉酶 15-20 份,植酸酶 10-15 份,中草药提取物 10-15 份,保护剂 10-15 份,激活剂 10-15 份。

2. 根据权利要求 1 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述香味麦芽酶制备方法如下:用麦芽重量 3-4%,温度为 40-50℃温水均匀喷雾麦芽粒表面,置混合机中均匀混合 3-5min;将回潮麦芽装入转筒式炒炉,在 10-15min 内温度升至 170-200℃,保温 10-15min,然后降温至 100-110℃,保温 20-30min,最后取出摊凉,加入麦芽粉碎机粉碎,调整辊间距为 0.5mm,转速为 250rpm,得到香味麦芽粉;将香味麦芽粉置于配料缸中,加入 3-6 倍的水,边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 0.6A/W-1.5A/W 条件下进行超声提取 10-15min;然后进行高压脉冲电场提取 15-20min,电场强度 20-40kV/cm,脉冲时间 400-600 $\mu$ s,脉冲频率 200-300Hz;将提取液首先于室温用 500-800 目滤布采用板框过滤器进行过滤,操作压力为 0.14-0.24MPa,然后采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩,直至浓缩液酶含量为超滤前的 10-15 倍;向浓缩液中加入浓缩液重量 3-5% 的保护剂,然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥,进风温度 150-160℃,排风温度 75-85℃,干燥时间 5-15s,产品水分 < 5%,即得香味麦芽酶。

3. 根据权利要求 1 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述饲用复合酶的制备方法如下:将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种经菌种活化和液体种子逐级扩大培养得到液体种子,以 6% 接种量接入发酵罐,培养温度 28-30℃,搅拌速度 200-700r/m,通风量(V/V) 1:1-3,培养时间 10-15h;然后以 1-2℃/h 降温速率缓慢降温至 10-15℃,恒温培养 15-20h;继续以 1-2℃/h 降温速率缓慢降温至 2-5℃,此时,将液体种子以 4% 接种量追加接入发酵罐,恒温培养 20-30h;最后以 1-2℃/h 升温速率缓慢升温至 10-15℃,恒温培养 15-20h;继续以 1-2℃/h 升温速率缓慢升温至 30-33℃,恒温培养 15-20h;发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶,所述调配过程加入浓缩酶液总重量 0.5-5% 中草药粉剂。

4. 根据权利要求 1 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述中草药提取物由以下重量份数的中草药制备:沙棘 20-30 份,决明子 20-30 份,枸杞 10-15 份,山药 10-15 份,北沙参 5-10 份,黄荆子 5-10 份,玉竹 3-5 份,薏米 3-5 份,大麦芽 3-5 份,桂花 3-5 份,黄芪 3-5 份。

5. 根据权利要求 4 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述中草药提取物的制备方法为:分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3-6 倍重量的水,控制温度 70℃~90℃保持 2~4h,然后降温至 45-60℃,加入混合酶制剂进行酶解,用乳酸调节 pH 值为 5.5-6.8,酶解 2-4h,最后添加混合物料 0.5-3 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 60℃~78℃保持 3~4h,过滤;滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上,然后冷冻干燥获得中草药提取物;

所述混合酶添加量为混合物料总重量的 5-10%;

所述混合酶的重量份数组成为:内  $\beta$ -葡聚糖酶 10-20 份,外  $\beta$ -葡聚糖酶 10-20 份, $\beta$ -葡萄糖苷酶 10-15 份,木聚糖酶 15-20 份,戊聚糖酶 15-20 份,普鲁兰酶 20-30 份, $\beta$ -淀粉酶 10-15 份,中性蛋白酶 10-15 份,酸性蛋白酶 10-15 份,超氧化物歧化酶 5-10 份,葡萄

糖氧化酶 5-10 份,酸性磷酸酶 5-10 份。

6. 根据权利要求 1 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述保护剂由以下重量份数的原料组成:海藻糖 20-30 份,NaCl 20-30 份, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10-15 份,半胱氨酸 10-15 份。

7. 根据权利要求 1 所述可提高动物食欲的饲料复配酶,其特征在于,所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成:氯化锌 30-40 份,氯化钙 10-20 份,硫酸钠 10-20 份,氯化镁 5-10 份。

8. 一种可提高动物食欲的饲料复配酶的制备方法,其特征在于,首先将所述保护剂、中草药提取物、香味麦芽酶、饲用复合酶分别超微粉碎,确保粒度小于所述酸性木聚糖酶及其它酶制剂,然后与酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶,均匀混合,最后加入激活剂,混合均匀后密封包装即得成品饲料复配酶。

9. 根据权利要求 8 所述可提高动物食欲的饲料复配酶的制备方法,其特征在于,所述香味麦芽酶制备方法如下:用麦芽重量 3-4%,温度为 40-50℃温水均匀喷雾麦芽粒表面,置混合机中均匀混合 3-5min;将回潮麦芽装入转筒式炒炉,在 10-15min 内温度升至 170-200℃,保温 10-15min,然后降温至 100-110℃,保温 20-30min,最后取出摊凉,加入麦芽粉碎机粉碎,调整辊间距为 0.5mm,转速为 250rpm,得到香味麦芽粉;将香味麦芽粉置于配料缸中,加入 3-6 倍的水,边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 0.6A/W-1.5A/W 条件下进行超声提取 10-15min;然后进行高压脉冲电场提取 15-20min,电场强度 20-40kV/cm,脉冲时间 400-600  $\mu$ s,脉冲频率 200-300Hz;将提取液首先于室温用 500-800 目滤布采用板框过滤机进行过滤,操作压力为 0.14-0.24MPa,然后采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩,直至浓缩液酶含量为超滤前的 10-15 倍;向浓缩液中加入浓缩液重量 3-5% 的保护剂,然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥,进风温度 150-160℃,排风温度 75-85℃,干燥时间 5-15s,产品水分 < 5%,即得香味麦芽酶。

10. 根据权利要求 8 所述可提高动物食欲的饲料复配酶的制备方法,其特征在于,所述饲料复配酶,由以下重量份数的酶制剂组成:香味麦芽酶 35 份,饲用复合酶 40 份,酸性木聚糖酶 25 份,纤维素酶 25 份, $\beta$ -葡聚糖酶 17 份,淀粉酶 17 份,植酸酶 13 份,中草药提取物 12 份,保护剂 13 份,激活剂 12 份;

所述酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶均为食品级酶制剂;

所述饲用复合酶制备方法包括如下步骤:

(1) 菌种活化

将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种接种于斜面培养基,28℃培养 36h 进行菌种活化,如此活化 2 次;

所述斜面培养基组成为:干酪素 4g,磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,硫酸亚铁 0.02g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,中草药粉剂 5g,蒸馏水 1000mL, pH 值 5.8,121℃灭菌 20min;

所述中草药粉剂的制备方法如下:

称取黄芪 20 份;党参 10 份;柴胡 10 份;黄芩 10 份;分别将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3 倍重量的水,控制温度 70℃保持 2h,添加混合物料 2 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 60℃保持 3h,过滤;滤液真空浓缩后冷冻干

燥获得中草药粉剂；

所述乙醇和丙醇的质量比例为 1 : 1 ；

(2) 液体种子扩大培养

①一级种子培养：将步骤(1)活化后的宇佐美曲霉斜面菌种以无菌水洗下孢子，接入 500 毫升摇瓶中，液体种子培养基装量 100 毫升，28℃、80rpm 摇床培养 36h ；

②二级种子培养：将一级种子按照 10% 的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中，培养条件与一级种子相同；

③三级种子培养：将二级种子以 8% 接种量接入 5000 毫升三级种子摇瓶中，液体培养基装量 1000 毫升，28℃、80rpm 摇床培养 36h ；

④种子罐培养：将三级种子以 8% 接种量接入总容积为 150L 的一级种子罐，种子罐培养基装量 100L，控制 pH 值为 5，培养温度 28℃，搅拌速度 200rpm，通风量(V/V)1:0.8，培养时间 36h，溶解氧 10% ；

所述一级、二级、三级种子培养基组成为：磷酸氢二钾 2g，氯化镁 0.6g，氯化钾 0.8g，硫酸亚铁 0.02g，葡萄糖 20g，中草药粉剂 15g，海藻糖 10g，蒸馏水 1000mL，pH 值 5.5，121℃ 灭菌 20min ；

所述种子罐培养基组成为：玉米粉 50-60g，豆粉 15-25g，麸皮 10-15g，鱼粉 10g，氯化钙 6g，氯化铵 1g，磷酸氢二钠 1g，中草药粉剂 15g，海藻糖 10g，纯净水 1000mL，pH 值 5，121℃ 灭菌 20min ；

所述种子罐发酵液菌体浓度为  $7.0 \times 10^8$  个 /ml ；

(3) 发酵罐发酵

将步骤(2)中种子罐液体种子以 6% 接种量接入发酵罐，培养温度 28℃，搅拌速度 200r/m，通风量(V/V)1:1，培养时间 10h ；然后以 1℃ /h 降温速率缓慢降温至 10℃，恒温培养 15h ；继续以 1℃ /h 降温速率缓慢降温至 2℃，此时，将步骤(2)中种子罐液体种子以 4% 接种量追加接入发酵罐，恒温培养 20h ；最后以 1℃ /h 升温速率缓慢升温至 10℃，恒温培养 15h ；继续以 1℃ /h 升温速率缓慢升温至 30℃，恒温培养 15h ；

溶解氧控制：通过调整搅拌转速及通风量，控制溶解氧 15% ；

pH 控制：通过补氨水或稀磷酸，控制发酵过程中 pH 值保持在 5 ；

补料控制：当发酵液中的还原糖含量降至 3mg/ml-8mg/ml 时，开始添加补料培养基，补料量以维持发酵液还原糖含量为 2mg/ml-5mg/ml ；

放罐标准：60% 菌体衰老自溶，酶活力增长缓慢 ；

所述发酵培养基组成为：玉米粉 50g，豆粉 15g，麸皮 10g，鱼粉 10g，氯化钙 6g，氯化铵 1g，磷酸氢二钠 1g，中草药粉剂 30g，海藻糖 10g，纯净水 1000mL，pH 值 5，121℃ 灭菌 20min ；

所述补料培养基重量百分比组成为：麦芽糊精 20%，玉米粉 10%，豆粉 15%，鱼粉 1.0%，氯化钙 0.6%，氯化铵 0.1%，磷酸氢二钠 0.1%，中草药粉剂 5%，不足部分纯净水补足，pH 值 5，121℃ 灭菌 30min ；

(4) 发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶 ；

所述调配过程加入浓缩酶液总重量 0.5% 中草药粉剂 ；

经上述制备方法得到的发酵液粗酶液中含有多种酶活力，其中，蛋白酶活力 6500U/ml、甘露聚糖酶活力 1500U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力 1200U/ml、果胶酶活力 1000U/ml ；

所述香味麦芽酶制备方法如下：

(1) 麦芽回潮：用麦芽重量 3.5%，温度为 45℃ 温水均匀喷雾麦芽粒表面，置混合机中均匀混合 4min；

(2) 烘焙：将回潮麦芽装入转筒式炒炉，在 12min 内温度升至 185℃，保温 12min，然后降温至 105℃，保温 25min，最后取出摊凉，得到香味麦芽；

(3) 粉碎：将香味麦芽加入麦芽粉碎机粉碎，调整辊间距为 0.5mm，转速为 250rpm，得到香味麦芽粉；

(4) 超声、PEF 提取：将香味麦芽粉置于配料缸中，加入 4 倍的水，边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 1.0A/W 条件下进行超声提取 12min；然后进行高压脉冲电场 (PEF) 提取 17min，电场强度 30kV/cm，脉冲时间 500 μs，脉冲频率 250Hz；

(5) 过滤：将提取液于室温用 650 目滤布采用板框过滤机进行过滤，操作压力为 0.19MPa；

(6) 超滤浓缩：采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩，直至浓缩液酶含量为超滤前的 12 倍；

(7) 干燥：向浓缩液中加入浓缩液重量 4% 的本发明保护剂，然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥，进风温度 155℃，排风温度 80℃，干燥时间 10s，产品水分 < 5%，即得香味麦芽酶；

所述中草药提取物的制备方法为：分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加 5 倍重量的水，控制温度 80℃ 保持 3h，然后降温至 53℃，加入混合酶制剂进行酶解，用乳酸调节 pH 值为 6.2，酶解 3h，最后添加混合物料 2 倍重量乙醇和丙醇的混合物，控制温度至 69℃ 保持 4h，过滤；滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上，然后冷冻干燥获得中草药提取物；

所述中草药的重量份数组成为：沙棘 25 份，决明子 25 份，枸杞 17 份，山药 13 份，北沙参 8 份，黄荆子 7 份，玉竹 4 份，薏米 4 份，大麦芽 4 份，桂花 4 份，黄芪 4 份；

混合酶添加量为混合物料总重量的 5-10%；

所述混合酶的重量份数组成为：内 β-葡聚糖酶 15 份，外 β-葡聚糖酶 15 份，β-葡萄糖苷酶 13 份，木聚糖酶 13 份，戊聚糖酶 13 份，普鲁兰酶 25 份，β-淀粉酶 12 份，中性蛋白酶 13 份，酸性蛋白酶 13 份，超氧化物歧化酶 7 份，葡萄糖氧化酶 7 份，酸性磷酸酶 7 份；

所述保护剂由以下重量份数的原料组成：海藻糖 25 份，NaCl 25 份，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 13 份，半胱氨酸 12 份；

所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 35 份，氯化钙 15 份，硫酸钠 15 份，氯化镁 7 份。

## 一种可提高动物食欲的饲料复配酶及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于酶制剂制备技术领域,具体是一种可提高动物食欲的饲料复配酶及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 在饲料中添加酶制剂主要有以下 4 个理由:1. 降解在动物饲料中存在的抗营养因子。这些物质不能被动物内源酶降解,从而干扰动物的正常代谢,导致动物消化不良,生产性能下降。2. 提高淀粉、蛋白质和矿物质的利用率。这些物质或者被富含纤维的细胞壁包围,或者以某些不能被动物消化的结构形式存在(例如在植物饲料原料中,大量的磷以植酸磷的形式存在。)。3. 在原料中降解某些特定的化学键。这些化学键不能被动物自身的酶所降解,加入外源酶以后可以释放更多的营养物。4. 由于幼龄动物自身消化系统还不成熟,内源酶不足添加外源酶可以提高饲料消化率,防止出现消化不良症状。除了可以提高日粮的利用率以外,加酶还可以减少饲料原料之间的差异,提高饲料配方的精确性,同时还可以提高动物生长的整齐性,减少管理成本,提高经济效益。使用酶制剂还可以保护环境。由于饲料的利用率提高了,相应的粪便排放量下降了。在效果比较明显的情况下,粪便的排放量可以减少 20% 左右,猪粪中氮的排放下降 15% 左右,鸡粪中氮的排放下降 20%。对于植酸磷,可以大幅度减少磷对环境的污染。

[0003] 目前在饲料工业中应用的酶制剂主要有 4 大类:分别用来降解纤维素、蛋白质、淀粉和植酸。

[0004] 纤维降解酶:对于单胃动物来说,消化的最大阻力是不能产生降解纤维的酶,在含有小麦、大麦、燕麦等组分的日粮中,很大一部分纤维是阿拉伯木聚糖和  $\beta$ -葡聚糖。水溶性的纤维能提高小肠内容物的粘度,阻碍养分的吸收,从而降低动物的生长性能。同时这种状况还和一些由于消化不良引起的疾病有关。如猪的食欲减退、禽的黑趾症和小猪拉稀。由于品种、生长地点和气候条件等因素的影响,大麦和小麦中纤维含量的变化很大,导致含有这些组分的日粮的营养价值差异很大。纤维降解酶、木聚糖酶和  $\beta$ -葡聚糖可以减少这些差异,提高动物的生长性能和整齐度。同时还可以减少某些消化不良的疾病。

[0005] 蛋白降解酶:在动物日粮中蛋白质来自各种饲料原料,它们最终通过降解的氨基酸存积在瘦肉中。在单胃动物日粮中,添加蛋白酶(不同饲料原料蛋白质和品质和可利用性)除了能充分降解大部分储蛋白质或储藏蛋白质或为动物可利用的小分子肽外,还能够通过降解抗营养因素而改善饲料营养价值。存积的效率差异很大。在植物蛋白源,如豆饼粉中存在着一一些抗营养因子,如几萜质和胰蛋白酶抑制因子,可能会对小肠吸收表面造成损害,影响营养物的吸收。另外,幼龄动物不完善的消化体系使得植物蛋白(如豆饼粉)中的蛋白质不能得到很好的利用。

[0006] 淀粉降解酶:许多营养学家认为玉米是饲料原料的“黄金标准”。绝大多数营养学家认为玉米不存在消化不良性,消化率超过 95%,但是最近 Noy 和 Sklan 研究表明(1994 年)在理想状态下,4—12 日龄的肉鸡日粮中,淀粉的消化率很少超过 85%,添加淀粉酶可以使淀

粉在小肠得到更多更快的降解。在仔猪断奶期,由于营养、环境和免疫系统的变化,体重会下降。在日粮中添加淀粉酶和其他一些酶,可以增加动物内源消化酶分泌,进而改进营养的消化吸收,提高饲料转化率和动物生长率。

[0007] 植酸降解酶:对于所有的动物来说,磷对于骨骼的矿化、免疫、繁殖、生长都是至关重要的。猪和家禽单胃动物只能利用植物饲料中 30—40% 的磷,其余 60—70% 的植酸磷是无法利用的。在许多情况下,饲料日粮中必须补充无机磷来满足动物生长的需要。饲料中一半以上的磷随着粪便排放到环境中,污染环境。添加植酸酶可以降解植酸,释放植酸分子中的磷。这样可以产生 2 个益处:1. 减少了饲料中磷的添加量。2. 减少了畜禽粪便对环境的磷污染。

[0008] 显而易见:作为饲料酶种的四大主角,他们的作用机理和模式在很大程度上决定或推动了动物饲料产业对于酶制剂技术的吸收运用。目前在肉鸡料中添加酶的产出投入比例超过 2:1。相对而言,在养猪业领域,酶制剂的使用情况就比较复杂,显得不明朗。集约化程度低,涉及环节比较多,酶制剂的使用效果很难进行商业计算。尽管在 20 世纪 50 年代已经有了使用酶制剂的设想,但是直到 20 世纪 80 年代才开始懂得如何在饲料工业中发挥酶的力量。饲料谷物,如小麦和大麦都含有比较高的单胃动物不能利用的纤维。如果纤维能够被降解,动物就能更好地利用营养物。在欧洲,大麦比较便宜,禽类营养学家和酶学家投入了大量精力研究了在含有大麦的肉鸡日粮中添加  $\beta$ -葡聚糖酶以减少其负面影响的可能性。其结果被证明是成功的,并得到了一个黄金定律:大麦 +  $\beta$ -葡聚糖酶 = 小麦。受到上述成功的鼓舞,小麦是第二个的研究对象。理论假设是:小麦 + 木聚糖酶 = 玉米。这一步的研究也获得了成功。在 20 世纪 90 年代中期,酶在饲料工业得到了普遍认可。可以毫不夸张地说:1996 年,在欧洲 80% 的肉鸡料(粘性谷物为能量来源)中含有纤维降解酶。由此强化和加快饲料产业对新技术的应用。从全球范围来看,大约 65% 的含有能产生粘性谷物的家禽饲料添加了纤维降解酶。而在猪饲料中的应用比例要低得多,接近 10%。其主要原因是市场的结构比较复杂,市场呈多元化,甚至无法测算。从地理分布来看,使用纤维素降解酶的地区主要集中在粘性谷物作为主要能量饲料的产区,例如:欧洲、加拿大、澳大利亚和新西兰。另外,在美国、南美和亚太地区,使用情况取决于玉米和小麦之间的比价。从这个意义上讲,欧洲是使用降解纤维素酶的核心细分市场。为了获得全球的认可,饲用酶厂家必须大举进军以玉米——豆粕型日粮为主的北美和亚太地区。玉米——豆粕型日粮历来被看作是“黄金标准”,尽管许多营养学家认为这些原料的变动性要比原来设想的变动性要大得多。现在,越来越多的证据表明这种黄金日粮也可以通过酶而改善其生产性能,尽管这类日粮与粗纤维或粘度相关的问题不严重。过去 10 年在研发玉米-豆粕第一代饲料酶上耗费很多,并于 1996 年开始成功应用,初期应用结果五花八门,但业界正开始变得越来越明白如何才能得心应手,加酶技术获得最大经济回报。据估算,该部分饲料酶市场份额为 2 千万美元,实际在使用玉米-豆粕日粮的肉鸡饲料只有 5% 为加酶饲料。1999/2000 年一降低粘度和粗纤维为日粮的饲料酶市场价值超过 1 亿美元。目前,植酸酶已经得到了全球的承认和应用。植酸酶的市场份额大约是每年 5000 万美元,在全球约有 8.0% 左右的猪禽饲料添加植酸酶。除了经济利益的原因外,还有一个因素是减少了粪中植酸磷的含量有利于保护环境。

[0009] 综上所述,饲料酶的应用有着其广阔的市场空间和巨大的经济价值,但饲料酶的

热稳定性、安全性、复配全面性及作用效果的充分发挥仍是酶制剂生产厂家和广大养殖户共同关注的一个重要问题,制备更安全,更全面,酶作用效果更好,可提高饲养畜禽食欲的饲料复配酶是本行业技术人员的共同责任和追求。

### 发明内容

[0010] 本发明所解决的技术问题是以酶系全面、天然安全、具有麦芽香味的香味麦芽酶和热稳定性、pH 稳定性强的饲用复合酶为基础,并科学复配中草药提取物、保护剂、激活剂和其它食品级饲料酶,制得的饲料复配酶不但为饲养畜禽提供了安全、全面的消化酶,减轻消化负担,提高原料利用率和生长率,有效保护环境,而且会给饲料带来愉悦的天然麦芽香味,增强畜禽的食欲,同时适量的激活剂可在同等条件下充分发挥酶制剂的效力,物尽其用,节约酶制剂添加量,中草药提取物的科学复配既可延长复合酶制剂的保质期,又可提高饲养畜禽的免疫力,从而达到一酶多用的效果。

[0011] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0012] 一种可提高动物食欲的饲料复配酶,由以下重量份数的酶制剂组成:

[0013] 香味麦芽酶 30-40 份,饲用复合酶 30-50 份,酸性木聚糖酶 20-30 份,纤维素酶 20-30 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15-20 份,淀粉酶 15-20 份,植酸酶 10-15 份,中草药提取物 10-15 份,保护剂 10-15 份,激活剂 10-15 份。

[0014] 所述酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶均为食品级酶制剂;

[0015] 所述饲用复合酶发酵液粗酶液中含有多种酶活力,其中,蛋白酶活力 6500-6700U/ml、甘露聚糖酶活力 1500-1700U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力 1200-1300U/ml、果胶酶活力 1000-1200U/ml。对发酵液粗酶液进行酶的热稳定性试验和 pH 稳定性试验,试验结果表明:在 30-75 $^{\circ}$ C, pH 值 2-7 时各酶均有较高的酶活力,达到 80% 以上。

[0016] 所述饲用复合酶的制备方法如下:将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种经菌种活化和一级、二级、三级液体种子及种子罐逐级扩大培养得到液体种子,以 6% 接种量接入发酵罐培养基,培养温度 28-30 $^{\circ}$ C,搅拌速度 200-700r/m,通风量(V/V) 1:1-3,培养时间 10-15h;然后以 1-2 $^{\circ}$ C/h 降温速率缓慢降温至 10-15 $^{\circ}$ C,恒温培养 15-20h;继续以 1-2 $^{\circ}$ C/h 降温速率缓慢降温至 2-5 $^{\circ}$ C,此时,将液体种子以 4% 接种量追加接入发酵罐,恒温培养 20-30h;最后以 1-2 $^{\circ}$ C/h 升温速率缓慢升温至 10-15 $^{\circ}$ C,恒温培养 15-20h;继续以 1-2 $^{\circ}$ C/h 升温速率缓慢升温至 30-33 $^{\circ}$ C,恒温培养 15-20h;发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶,所述调配过程加入浓缩酶液总重量 0.5-5% 中草药粉剂。

[0017] 所述斜面培养基组成为:干酪素 4g,磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,硫酸亚铁 0.02g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,中草药粉剂 5-20g,蒸馏水 1000mL, pH 值 5.8, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20min。

[0018] 所述中草药粉剂的制备方法如下:

[0019] 称取黄芪 20-30 份;党参 10-18 份;柴胡 10-15 份;黄芩 10-15 份;分别将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3-6 倍重量的水,控制温度 70 $^{\circ}$ C-90 $^{\circ}$ C 保持 2-4h,添加混合物料 2-3 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 60 $^{\circ}$ C-78 $^{\circ}$ C 保持 3-4h,过滤;滤液真空浓缩后冷冻干燥获得中草药粉剂。

[0020] 所述乙醇和丙醇的质量比例为 1:1-1.5。



[0021] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为：磷酸氢二钾 2g，氯化镁 0.6g，氯化钾 0.8g，硫酸亚铁 0.02g，葡萄糖 20g，中草药粉剂 15-25g，海藻糖 10-30g，蒸馏水 1000mL，pH 值 5.5，121℃灭菌 20min。

[0022] 所述种子罐培养基组成为：玉米粉 50-60g，豆粉 15-25g，麸皮 10-15g，鱼粉 10-15g，氯化钙 6-10g，氯化铵 1-3g，磷酸氢二钠 1-2g，中草药粉剂 15-20g，海藻糖 10-30g，纯净水 1000mL，pH 值 5-7，121℃灭菌 20min。

[0023] 所述种子罐发酵液菌体浓度为  $7.0 \times 10^8$ - $8.0 \times 10^8$  个/ml；

[0024] 所述发酵培养基组成为：玉米粉 50-60g，豆粉 15-25g，麸皮 10-15g，鱼粉 10-15g，氯化钙 6-10g，氯化铵 1-3g，磷酸氢二钠 1-2g，中草药粉剂 30-50g，海藻糖 10-30g，纯净水 1000mL，pH 值 5-7，121℃灭菌 20min。

[0025] 所述发酵罐发酵过程补料培养基重量百分比组成为：麦芽糊精 20-30%，玉米粉 10-20%，豆粉 15-25%，鱼粉 1.0-1.5%，氯化钙 0.6-1.0%，氯化铵 0.1-0.3%，磷酸氢二钠 0.1-0.2%，中草药粉剂 5-10%，不足部分纯净水补足，pH 值 5-7，121-123℃灭菌 30-40min。

[0026] 所述香味麦芽酶制备方法如下：

[0027] (1) 麦芽回潮：用麦芽重量 3-4%，温度为 40-50℃温水均匀喷雾麦芽粒表面，置混合机中均匀混合 3-5min。

[0028] (2) 烘焙：将回潮麦芽装入转筒式炒炉，在 10-15min 内温度升至 170-200℃，保温 10-15min，然后降温至 100-110℃，保温 20-30min，最后取出摊凉，得到香味麦芽；

[0029] (3) 粉碎：将香味麦芽加入麦芽粉碎机粉碎，调整辊间距为 0.5mm，转速为 250rpm，得到香味麦芽粉；

[0030] (4) 超声、PEF 提取：将香味麦芽粉置于配料缸中，加入 3-6 倍的水，边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 0.6A/W-1.5A/W 条件下进行超声提取 10-15min；然后进行高压脉冲电场 (PEF) 提取 15-20min，电场强度 20-40kV/cm，脉冲时间 400-600  $\mu$ s，脉冲频率 200-300Hz；

[0031] (5) 过滤：将提取液于室温用 500-800 目滤布采用板框过滤机进行过滤，操作压力为 0.14-0.24MPa；

[0032] (6) 超滤浓缩：采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩，直至浓缩液酶含量为超滤前的 10-15 倍；

[0033] (7) 干燥：向浓缩液中加入浓缩液重量 3-5% 的本发明保护剂，然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥，进风温度 150-160℃，排风温度 75-85℃，干燥时间 5-15s，产品水分 < 5%，即得香味麦芽酶。

[0034] 所述中草药提取物的制备方法为：分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加 3-6 倍重量的水，控制温度 70℃-90℃保持 2-4h，然后降温至 45-60℃，加入混合酶制剂进行酶解，用乳酸调节 pH 值为 5.5-6.8，酶解 2-4h，最后添加混合物料 0.5-3 倍重量乙醇和丙醇的混合物，控制温度至 60℃-78℃保持 3-4h，过滤；滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上，然后冷冻干燥获得中草药提取物。

[0035] 所述中草药的重量份数组成为：沙棘 20-30 份，决明子 20-30 份，枸杞 10-15 份，山药 10-15 份，北沙参 5-10 份，黄荆子 5-10 份，玉竹 3-5 份，薏米 3-5 份，大麦芽 3-5 份，桂花 3-5 份，黄芪 3-5 份；

[0036] 混合酶添加量为混合物料总重量的 5-10%；

[0037] 所述混合酶的重量份数组成为：内  $\beta$ -葡聚糖酶 10-20 份，外  $\beta$ -葡聚糖酶 10-20 份， $\beta$ -葡萄糖苷酶 10-15 份，木聚糖酶 15-20 份，戊聚糖酶 15-20 份，普鲁兰酶 20-30 份， $\beta$ -淀粉酶 10-15 份，中性蛋白酶 10-15 份，酸性蛋白酶 10-15 份，超氧化物歧化酶 5-10 份，葡萄糖氧化酶 5-10 份，酸性磷酸酶 5-10 份；

[0038] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：海藻糖 20-30 份，NaCl 20-30 份， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

[0039] 10-15 份，半胱氨酸 10-15 份。

[0040] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 30-40 份，氯化钙 10-20 份，硫酸钠 10-20 份，氯化镁 5-10 份。

[0041] 本发明饲料复配酶的制备方法：

[0042] 将所述保护剂、中草药提取物、香味麦芽酶、饲用复合酶分别超微粉碎，确保粒度小于所述酸性木聚糖酶及其它酶制剂，然后与酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶，均匀混合，最后加入激活剂，混合均匀后密封包装即得成品饲料复配酶。

[0043] 本发明的高产饲用复合酶的黑曲霉菌株具体为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) DM-18，是从湖南省津市市洋由乡腐殖土、稻草混合样土分离得到的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) HYX0022 经紫外诱变、紫外亚硝酸诱变、紫外线亚硝基胍复合诱变，然后对突变株逐级筛选淘汰，最后对优良菌株经发酵性能测试筛选得到产饲用复合酶的黑曲霉 DM-18。该菌株已于 2013 年 11 月 3 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (简称 CCTCC，地址为：中国·武汉·武汉大学，邮编：430072)，保藏号为 CCTCC NO:M2013541，分类命名为黑曲霉 DM-18 *Aspergillus niger* DM-18。

[0044] 本发明提供的高产饲用复合酶的黑曲霉 DM-18 (CCTCC NO:M2013541) 具有以下微生物学特征：

[0045] 1、形态学特征：

[0046] 黑曲霉 DM-18，生物学形态为包括分生孢子、孢梗、顶囊、产孢结构等几部分。分生孢子头球形至辐射形，直径 150-450  $\mu\text{m}$ ，分生孢子梗发生于基质。孢梗茎 1000-3000 (长度)  $\times$  12-20 (直径)  $\mu\text{m}$ ，黄色或黄褐色，壁平滑；顶囊球形或近似球形，直径 35-50  $\mu\text{m}$ ，表面全面可育；产孢结构双层，梗基 15-20 (长度)  $\times$  3-4.0 (直径)  $\mu\text{m}$ ，孢梗 6-8 (长度)  $\times$  2-4 (直径)  $\mu\text{m}$ ，分生孢子球形或近球形，较小，直径 3.5-5.0  $\mu\text{m}$ ，褐色，壁粗糙。

[0047] 2、培养学特征：

[0048] 黑曲霉 DM-18 在麦芽汁琼脂培养基上生长迅速，28 $^{\circ}\text{C}$  4 天直径 65mm；质地丝绒状或稍带絮状；分生孢子结构大量，褐黑色，有少量渗出液；菌落反面略带黄色。

[0049] 3、生理生化特征：

[0050] 黑曲霉 DM-18 可在马铃薯、玉米粉、可溶性淀粉，糖蜜等上生长，最适 PH 值 4.6，最适生长温度 28-34 $^{\circ}\text{C}$ ，最适产酶温度 28-30 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0051] 黑曲霉 DM-18 的筛选技术路线为：原始菌株分离、筛选与鉴定  $\rightarrow$  出发菌株  $\rightarrow$  斜面培养  $\rightarrow$  孢子悬液的制备  $\rightarrow$  诱变处理  $\rightarrow$  平板分离  $\rightarrow$  初筛  $\rightarrow$  复筛  $\rightarrow$  再复筛  $\rightarrow$  扩大实验 (发酵性能测定)。

[0052] 有益效果：

[0053] 1. 本发明中的饲用复合酶以高产饲用复合酶的菌株黑曲霉 DM-18 为出发菌株, 并进行培养基优化和发酵工艺改进, 采用梯度降温和梯度升温的发酵工艺, 同时予以追加接种和适时补料, 尤其是梯度降温和梯度升温的发酵工艺显著提高了出发菌株的抗应激能力, 致使菌种的产酶能力最大限度地显现。并且本发明对培养基组成实施全程优化, 添加了具有抗热应激原作用的黄芩、柴胡, 添加了具有调整和修复机体功能、增强机体的免疫功能、具有微生态调节功能的黄芪、党参等, 进一步增强了微生物在同一发酵环境下的机体功能性、传代适应性和共同协作性, 进而增强了微生物的代谢功能, 使得本发明所产饲用复合酶活力高、耐受温度较高、稳定性强、适于工业化生产。所述饲用复合酶发酵液粗酶液中含有多种酶活力, 其中, 蛋白酶活力 6500-6700U/ml、甘露聚糖酶活力 1500-1700U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力 1200-1300U/ml、果胶酶活力 1000-1200U/ml。对发酵液粗酶液进行酶的热稳定性试验和 pH 稳定性试验, 试验结果表明: 在 30-75°C, pH 值 2-7 时各酶均有较高的酶活力, 达到 80% 以上。本发明饲用复合酶热稳定性和 pH 稳定性强, 更加适合饲料工业加工工艺需求, 加工后的饲料酶活损失低。

[0054] 2. 本发明饲料中的香味麦芽酶以优质进口麦芽为原料, 采用超声波、高压脉冲电场技术(pulsed electric field 简称“PEF”)等方法最大限度的提取麦芽酶系酶源, 是一种天然的复合酶, 其酶源品种及单酶特性 100% 来自啤酒麦芽, 酶解效果远远优于采用微生物发酵制得的单酶及其组合; 其中的香味麦芽酶不仅可以提供酶源, 最主要的是其浓郁、独特的麦芽香味可明显提高饲养畜禽的食欲。

[0055] 3. 本发明饲料复配酶中的保护剂采用多糖、无机盐和氨基酸科学复配, 有效减缓了香味麦芽酶及复配酶制剂的回潮; 同时可增强复配酶的耐冻、耐热性能, 保持相同的酶活力, 其耐热温度可提高 20-30°C, 耐冷冻温度可降低 10-15°C, 有效防止了复配酶在运输、保存和使用过程中酶活力的损失, 延长了复配酶的保质期, 达到同样的酶活力, 同类产品保质期可延长 2-3 年。

[0056] 4. 本发明饲料复配酶添加无机盐作为激活剂, 创造了酶催化作用的最佳条件, 充分发挥了复配酶各酶组份的活力, 彻底有效的分解了饲料中淀粉、蛋白质、纤维素、植酸等大分子物质, 大大减轻了畜禽动物的消化负担, 提高了原料利用率和畜禽的生长率, 同时有效防止了畜禽粪便造成的环境污染, 保护了饲养环境。

[0057] 5. 本发明饲料复配酶添加的中草药提取物既可延长复配酶制剂的保质期, 又可提高饲养畜禽的免疫力, 有效防止畜禽流行性疾病的发生。

[0058] 6. 本发明饲料复配酶中保护剂与酶制剂、激活剂与酶制剂、中草药提取物与酶制剂的共同协同作用, 使得复配酶的酶活力和效力最大限度的发挥, 并相应的提高了饲料的利用率和动物的生长率, 增强了动物的食欲和抗病能力, 延长了复配酶的保质期和保护了环境。

## 具体实施方式

[0059] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明, 本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外, 实施方案应理解为说明性的, 而非限制本发明的范围, 本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言, 在不背离本发明实质和范围的前提下, 对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也

属于本发明的保护范围。

[0060] 实施例 1

[0061] 一种可提高动物食欲的饲料复配酶,由以下重量份数的酶制剂组成:

[0062] 香味麦芽酶 35 份,饲用复合酶 40 份,酸性木聚糖酶 25 份,纤维素酶 25 份, $\beta$ -葡聚糖酶 17 份,淀粉酶 17 份,植酸酶 13 份,中草药提取物 12 份,保护剂 13 份,激活剂 12 份。

[0063] 所述酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶均为食品级酶制剂;

[0064] 所述饲用复合酶制备方法包括如下步骤:

[0065] (1) 菌种活化

[0066] 将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种接种于斜面培养基,28℃培养 36h 进行菌种活化,如此活化 2 次;

[0067] 所述斜面培养基组成为:干酪素 4g,磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,硫酸亚铁 0.02g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,中草药粉剂 5g,蒸馏水 1000mL, pH 值 5.8,121℃灭菌 20min;

[0068] 所述中草药粉剂的制备方法如下:

[0069] 称取黄芪 20 份;党参 10 份;柴胡 10 份;黄芩 10 份;分别将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3 倍重量的水,控制温度 70℃保持 2h,添加混合物料 2 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 60℃保持 3h,过滤;滤液真空浓缩后冷冻干燥获得中草药粉剂。

[0070] 所述乙醇和丙醇的质量比例为 1:1。

[0071] (2) 液体种子扩大培养

[0072] ①一级种子培养:将步骤(1)活化后的宇佐美曲霉斜面菌种以无菌水洗下孢子,接入 500 毫升摇瓶中,液体种子培养基装量 100 毫升,28℃、80rpm 摇床培养 36h;

[0073] ②二级种子培养:将一级种子按照 10%的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中,培养条件与一级种子相同;

[0074] ③三级种子培养:将二级种子以 8%接种量接入 5000 毫升三级种子摇瓶中,液体培养基装量 1000 毫升,28℃、80rpm 摇床培养 36h;

[0075] ④种子罐培养:将三级种子以 8%接种量接入总容积为 150L 的一级种子罐,种子罐培养基装量 100L,控制 pH 值为 5,培养温度 28℃,搅拌速度 200rpm,通风量(V/V)1:0.8,培养时间 36h,溶解氧 10%;

[0076] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为:磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,硫酸亚铁 0.02g,葡萄糖 20g,中草药粉剂 15g,海藻糖 10g,蒸馏水 1000mL, pH 值 5.5,121℃灭菌 20min。

[0077] 所述种子罐培养基组成为:玉米粉 50-60g,豆粉 15-25g,麸皮 10-15g,鱼粉 10g,氯化钙 6g,氯化铵 1g,磷酸氢二钠 1g,中草药粉剂 15g,海藻糖 10g,纯净水 1000mL, pH 值 5,121℃灭菌 20min。

[0078] 所述种子罐发酵液菌体浓度为  $7.0 \times 10^8$  个/ml;

[0079] (3) 发酵罐发酵

[0080] 将步骤(2)中种子罐液体种子以 6%接种量接入发酵罐,培养温度 28℃,搅拌速度 200r/m,通风量(V/V)1:1,培养时间 10h;然后以 1℃/h 降温速率缓慢降温至 10℃,恒温培

养 15h ;继续以 1℃ /h 降温速率缓慢降温至 2℃,此时,将步骤(2)中种子罐液体种子以 4% 接种量追加接入发酵罐,恒温培养 20h ;最后以 1℃ /h 升温速率缓慢升温至 10℃,恒温培养 15h ;继续以 1℃ /h 升温速率缓慢升温至 30℃,恒温培养 15h ;

[0081] 溶解氧控制 :通过调整搅拌转速及通风量,控制溶解氧 15% ;

[0082] PH 控制 :通过补氨水或稀磷酸,控制发酵过程中 pH 值保持在 5 ;

[0083] 补料控制 :当发酵液中的还原糖含量降至 3mg/ml-8mg/ml 时,开始添加补料培养基,补料量以维持发酵液还原糖含量为 2mg/ml-5mg/ml ;

[0084] 放罐标准 :60% 菌体衰老自溶,酶活力增长缓慢。

[0085] 所述发酵培养基组成为 :玉米粉 50g,豆粉 15g,麸皮 10g,鱼粉 10g,氯化钙 6g,氯化铵 1g,磷酸氢二钠 1g,中草药粉剂 30g,海藻糖 10g,纯净水 1000mL, pH 值 5,121℃ 灭菌 20min。

[0086] 所述补料培养基重量百分比组成为 :麦芽糊精 20%,玉米粉 10%,豆粉 15%,鱼粉 1.0%,氯化钙 0.6%,氯化铵 0.1%,磷酸氢二钠 0.1%,中草药粉剂 5%,不足部分纯净水补足,pH 值 5,121℃ 灭菌 30min。

[0087] (4) 发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶。

[0088] 所述调配过程加入浓缩酶液总重量 0.5% 中草药粉剂。

[0089] 经上述制备方法得到的发酵液粗酶液中含有多种酶活力,其中,蛋白酶活力 6500U/ml、甘露聚糖酶活力 1500U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力 1200U/ml、果胶酶活力 1000U/ml。

[0090] 所述香味麦芽酶制备方法如下 :

[0091] (1) 麦芽回潮 :用麦芽重量 3.5%,温度为 45℃ 温水均匀喷雾麦芽粒表面,置混合机中均匀混合 4min。

[0092] (2) 烘焙 :将回潮麦芽装入转筒式炒炉,在 12min 内温度升至 185℃,保温 12min,然后降温至 105℃,保温 25min,最后取出摊凉,得到香味麦芽 ;

[0093] (3) 粉碎 :将香味麦芽加入麦芽粉碎机粉碎,调整辊间距为 0.5mm,转速为 250rpm,得到香味麦芽粉 ;

[0094] (4) 超声、PEF 提取 :将香味麦芽粉置于配料缸中,加入 4 倍的水,边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 1.0A/W 条件下进行超声提取 12min ;然后进行高压脉冲电场 (PEF) 提取 17min,电场强度 30kV/cm,脉冲时间 500  $\mu$ s,脉冲频率 250Hz ;

[0095] (5) 过滤 :将提取液于室温用 650 目滤布采用板框过滤机进行过滤,操作压力为 0.19MPa ;

[0096] (6) 超滤浓缩 :采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩,直至浓缩液酶含量为超滤前的 12 倍 ;

[0097] (7) 干燥 :向浓缩液中加入浓缩液重量 4% 的本发明保护剂,然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥,进风温度 155℃,排风温度 80℃,干燥时间 10s,产品水分 < 5%,即得香味麦芽酶。

[0098] 所述中草药提取物的制备方法为 :分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 5 倍重量的水,控制温度 80℃ 保持 3h,然后降温至 53℃,加入混合酶制剂进行酶解,用乳酸调节 pH 值为 6.2,酶解 3h,最后添加混合物料 2 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 69℃ 保持 4h,过滤 ;滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上,然后冷

冻干燥获得中草药提取物。

[0099] 所述中草药的重量份数组成为：沙棘 25 份，决明子 25 份，枸杞 17 份，山药 13 份，北沙参 8 份，黄荆子 7 份，玉竹 4 份，薏米 4 份，大麦芽 4 份，桂花 4 份，黄芪 4 份；

[0100] 混合酶添加量为混合物料总重量的 5-10%；

[0101] 所述混合酶的重量份数组成为：内  $\beta$ -葡聚糖酶 15 份，外  $\beta$ -葡聚糖酶 15 份， $\beta$ -葡萄糖苷酶 13 份，木聚糖酶 13 份，戊聚糖酶 13 份，普鲁兰酶 25 份， $\beta$ -淀粉酶 12 份，中性蛋白酶 13 份，酸性蛋白酶 13 份，超氧化物歧化酶 7 份，葡萄糖氧化酶 7 份，酸性磷酸酶 7 份；

[0102] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：海藻糖 25 份，NaCl 25 份， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  13 份，半胱氨酸 12 份。

[0103] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 35 份，氯化钙 15 份，硫酸钠 15 份，氯化镁 7 份。

[0104] 本发明饲料复配酶的制备方法：

[0105] 将所述保护剂、中草药提取物、香味麦芽酶、饲用复合酶分别超微粉碎，确保粒度小于所述酸性木聚糖酶及其它酶制剂，然后与酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶，均匀混合，最后加入激活剂，混合均匀后密封包装即得成品饲料复配酶。

[0106] 实施例 2

[0107] 一种可提高动物食欲的饲料复配酶，由以下重量份数的酶制剂组成：

[0108] 香味麦芽酶 30 份，饲用复合酶 30 份，酸性木聚糖酶 20 份，纤维素酶 20 份， $\beta$ -葡聚糖酶 15 份，淀粉酶 15 份，植酸酶 10 份，中草药提取物 10 份，保护剂 10 份，激活剂 10 份。

[0109] 所述酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶均为食品级酶制剂；

[0110] 所述饲用复合酶制备方法包括如下步骤：

[0111] (1) 菌种活化

[0112] 将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种接种于斜面培养基，34℃ 培养 48h 进行菌种活化，如此活化 4 次；

[0113] 所述斜面培养基组成为：干酪素 4g，磷酸氢二钾 2g，氯化镁 0.6g，氯化钾 0.8g，硫酸亚铁 0.02g，葡萄糖 20g，琼脂 20g，中草药粉剂 20g，蒸馏水 1000mL，pH 值 5.8，121℃ 灭菌 20min。

[0114] 所述中草药粉剂的制备方法如下：

[0115] 称取黄芪 30 份；党参 18 份；柴胡 15 份；黄芩 15 份；分别将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加 6 倍重量的水，控制温度 90℃ 保持 4h，添加混合物料 3 倍重量乙醇和丙醇的混合物，控制温度至 78℃ 保持 4h，过滤；滤液真空浓缩后冷冻干燥获得中草药粉剂。

[0116] 所述乙醇和丙醇的质量比例为 1:1.5。

[0117] (2) 液体种子扩大培养

[0118] ①一级种子培养：将步骤(1)活化后的斜面菌种以无菌水洗下孢子，接入 500 毫升摇瓶中，液体种子培养基装量 100 毫升，34℃、120rpm 摇床培养 48h；

[0119] ②二级种子培养：将一级种子按照 10% 的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中，培养条件与一级种子相同；

[0120] ③三级种子培养:将二级种子以8%接种量接入5000毫升三级种子摇瓶中,液体培养基装量1000毫升,34℃、120rpm摇床培养48h;

[0121] ④种子罐培养:将三级种子以8%接种量接入总容积为150L的一级种子罐,种子罐培养基装量100L,控制pH值为5-7,培养温度30℃,搅拌速度400rpm,通风量(V/V)1:1.2,培养时间48h,溶解氧20%;

[0122] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为:磷酸氢二钾2g,氯化镁0.6g,氯化钾0.8g,硫酸亚铁0.02g,葡萄糖20g,中草药粉剂25g,海藻糖30g,蒸馏水1000mL,pH值5.5,121℃灭菌20min。

[0123] 所述种子罐培养基组成为:玉米粉60g,豆粉25g,麸皮15g,鱼粉15g,氯化钙10g,氯化铵3g,磷酸氢二钠2g,中草药粉剂20g,海藻糖30g,纯净水1000mL,pH值7,121℃灭菌20min。

[0124] 所述种子罐发酵液菌体浓度为 $8.0 \times 10^8$ 个/ml;

[0125] (3) 发酵罐发酵

[0126] 将步骤(2)中种子罐液体种子以6%接种量接入发酵罐,培养温度30℃,搅拌速度700r/m,通风量(V/V)1:3,培养时间15h;然后以2℃/h降温速率缓慢降温至15℃,恒温培养20h;继续以2℃/h降温速率缓慢降温至5℃,此时,将步骤(2)中种子罐液体种子以4%接种量追加接入发酵罐,恒温培养30h;最后以2℃/h升温速率缓慢升温至15℃,恒温培养20h;继续以2℃/h升温速率缓慢升温至34℃,恒温培养20h;

[0127] 溶解氧控制:通过调整搅拌转速及通风量,控制溶解氧30%;

[0128] PH控制:通过补氨水或稀磷酸,控制发酵过程中pH值保持在6;

[0129] 补料控制:当发酵液中的还原糖含量降至3mg/ml-8mg/ml时,开始添加补料培养基,补料量以维持发酵液还原糖含量为2mg/ml-5mg/ml;

[0130] 放罐标准:80%菌体衰老自溶,酶活力增长缓慢。

[0131] 所述发酵培养基组成为:玉米粉60g,豆粉25g,麸皮15g,鱼粉15g,氯化钙10g,氯化铵3g,磷酸氢二钠2g,中草药粉剂50g,海藻糖30g,纯净水1000mL,pH值7,121℃灭菌20min。

[0132] 所述补料培养基重量百分比组成为:麦芽糊精30%,玉米粉20%,豆粉25%,鱼粉1.5%,氯化钙1.0%,氯化铵0.3%,磷酸氢二钠0.2%,中草药粉10%,不足部分纯净水补足,pH值7,123℃灭菌40min。

[0133] (4) 发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶。

[0134] 所述调配过程加入浓缩酶液总重量5%中草药粉剂。

[0135] 经上述制备方法得到的发酵液发酵液粗酶液中含有多种酶活力,其中,蛋白酶活力6600U/ml、甘露聚糖酶活力1600U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力1240U/ml、果胶酶活力1080U/ml。

[0136] 所述香味麦芽酶制备方法如下:

[0137] (1) 麦芽回潮:用麦芽重量3%,温度为40℃温水均匀喷雾麦芽粒表面,置混合机中均匀混合3min。

[0138] (2) 烘焙:将回潮麦芽装入转筒式炒炉,在105min内温度升至170℃,保温10min,然后降温至100℃,保温20min,最后取出摊凉,得到香味麦芽;

[0139] (3)粉碎:将香味麦芽加入麦芽粉碎机粉碎,调整辊间距为 0.5mm,转速为 250rpm,得到香味麦芽粉;

[0140] (4)超声、PEF 提取:将香味麦芽粉置于配料缸中,加入 3 倍的水,边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 0.6A/W 条件下进行超声提取 10min;然后进行高压脉冲电场(PEF)提取 15min,电场强度 20kV/cm,脉冲时间 400  $\mu$ s,脉冲频率 200Hz;

[0141] (5)过滤:将提取液于室温用 500 目滤布采用板框过滤机进行过滤,操作压力为 0.14MPa;

[0142] (6)超滤浓缩:采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩,直至浓缩液酶含量为超滤前的 10-15 倍;

[0143] (7)干燥:向浓缩液中加入浓缩液重量 3% 的本发明保护剂,然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥,进风温度 150 $^{\circ}$ C,排风温度 75 $^{\circ}$ C,干燥时间 5s,产品水分 < 5%,即得香味麦芽酶。

[0144] 所述中草药提取物的制备方法为:分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3 倍重量的水,控制温度 70 $^{\circ}$ C 保持 2h,然后降温至 45 $^{\circ}$ C,加入混合酶制剂进行酶解,用乳酸调节 pH 值为 5.5,酶解 2h,最后添加混合物料 0.5 倍重量乙醇和丙醇的混合物,控制温度至 60 $^{\circ}$ C 保持 3h,过滤;滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上,然后冷冻干燥获得中草药提取物。

[0145] 所述中草药的重量份数组成为:沙棘 20 份,决明子 20 份,枸杞 10 份,山药 10 份,北沙参 5 份,黄荆子 5 份,玉竹 3 份,薏米 3 份,大麦芽 3 份,桂花 3 份,黄芪 3 份;

[0146] 混合酶添加量为混合物料总重量的 5%;

[0147] 所述混合酶的重量份数组成为:内  $\beta$ -葡聚糖酶 10 份,外  $\beta$ -葡聚糖酶 10 份, $\beta$ -葡萄糖苷酶 10 份,木聚糖酶 15 份,戊聚糖酶 15 份,普鲁兰酶 20 份, $\beta$ -淀粉酶 10 份,中性蛋白酶 10 份,酸性蛋白酶 10 份,超氧化物歧化酶 5 份,葡萄糖氧化酶 5 份,酸性磷酸酶 5 份;

[0148] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成:海藻糖 20 份,NaCl 20 份,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 份,半胱氨酸 10 份。

[0149] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成:氯化锌 30 份,氯化钙 10 份,硫酸钠 10 份,氯化镁 5 份。

[0150] 本发明饲料复配酶的制备方法如上。

[0151] 实施例 3

[0152] 一种可提高动物食欲的饲料复配酶,由以下重量份数的酶制剂组成:

[0153] 香味麦芽酶 40 份,饲用复合酶 50 份,酸性木聚糖酶 30 份,纤维素酶 30 份, $\beta$ -葡聚糖酶 20 份,淀粉酶 20 份,植酸酶 15 份,中草药提取物 15 份,保护剂 15 份,激活剂 15 份。

[0154] 所述酸性木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、淀粉酶、植酸酶均为食品级酶制剂;

[0155] 所述饲用复合酶制备方法包括如下步骤:

[0156] (1)菌种活化

[0157] 将保存完好的黑曲霉 DM-18 的斜面菌种接种于斜面培养基,30 $^{\circ}$ C 培养 42h 进行菌种活化,如此活化 3 次;

[0158] 所述斜面培养基组成为:干酪素 4g,磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,硫



酸亚铁 0.02g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 中草药粉剂 12g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 5.8, 121℃ 灭菌 20min。

[0159] 所述中草药粉剂的制备方法如下：

[0160] 称取黄芪 25 份；党参 15 份；柴胡 12 份；黄芩 12 份；分别将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加 5 倍重量的水，控制温度 80℃ 保持 3h，添加混合物料 3 倍重量乙醇和丙醇的混合物，控制温度至 70℃ 保持 4h，过滤；滤液真空浓缩后冷冻干燥获得中草药粉剂。

[0161] 所述乙醇和丙醇的质量比例为 1 : 1.2。

[0162] (2) 液体种子扩大培养

[0163] ①一级种子培养：将步骤(1)活化后的斜面菌种以无菌水洗下孢子，接入 500 毫升摇瓶中，液体种子培养基装量 100 毫升，30℃、100rpm 摇床培养 42h；

[0164] ②二级种子培养：将一级种子按照 10% 的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中，培养条件与一级种子相同；

[0165] ③三级种子培养：将二级种子以 8% 接种量接入 5000 毫升三级种子摇瓶中，液体培养基装量 1000 毫升，30℃、100rpm 摇床培养 42h；

[0166] ④种子罐培养：将三级种子以 8% 接种量接入总容积为 150L 的一级种子罐，种子罐培养基装量 100L，控制 pH 值为 6，培养温度 30℃，搅拌速度 300rpm，通风量(V/V)1:1，培养时间 42h，溶解氧 20%；

[0167] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为：磷酸氢二钾 2g，氯化镁 0.6g，氯化钾 0.8g，硫酸亚铁 0.02g，葡萄糖 20g，中草药粉剂 20g，海藻糖 20g，蒸馏水 1000mL，pH 值 5.5，121℃ 灭菌 20min。

[0168] 所述种子罐培养基组成为：玉米粉 55g，豆粉 20g，麸皮 12g，鱼粉 12g，氯化钙 8g，氯化铵 2g，磷酸氢二钠 2g，中草药粉剂 18g，海藻糖 20g，纯净水 1000mL，pH 值 6，121℃ 灭菌 20min。

[0169] 所述种子罐发酵液菌体浓度为  $7.5 \times 10^8$  个 /ml；

[0170] (3) 发酵罐发酵

[0171] 将步骤(2)中种子罐液体种子以 6% 接种量接入发酵罐，培养温度 30℃，搅拌速度 350r/m，通风量(V/V)1:2，培养时间 12h；然后以 2℃ /h 降温速率缓慢降温至 12℃，恒温培养 18h；继续以 2℃ /h 降温速率缓慢降温至 4℃，此时，将步骤(2)中种子罐液体种子以 4% 接种量追加接入发酵罐，恒温培养 25h；最后以 2℃ /h 升温速率缓慢升温至 12℃，恒温培养 18h；继续以 2℃ /h 升温速率缓慢升温至 30℃，恒温培养 18h；

[0172] 溶解氧控制：通过调整搅拌转速及通风量，控制溶解氧 20%；

[0173] PH 控制：通过补氨水或稀磷酸，控制发酵过程中 pH 值保持在 5.2；

[0174] 补料控制：当发酵液中的还原糖含量降至 3mg/ml-8mg/ml 时，开始添加补料培养基，补料量以维持发酵液还原糖含量为 2mg/ml-5mg/ml；

[0175] 放罐标准：70% 菌体衰老自溶，酶活力增长缓慢。

[0176] 所述发酵培养基组成为：玉米粉 55g，豆粉 20g，麸皮 12g，鱼粉 12g，氯化钙 8g，氯化铵 2g，磷酸氢二钠 2g，中草药粉剂 40g，海藻糖 20g，纯净水 1000mL，pH 值 6，121℃ 灭菌 20min。

[0177] 所述补料培养基重量百分比组成为：麦芽糊精 25%，玉米粉 15%，豆粉 18%，鱼粉 1.2%，氯化钙 0.8%，氯化铵 0.2%，磷酸氢二钠 0.2%，中草药粉剂 8%，不足部分纯净水补足，pH 值 6，123℃灭菌 40min。

[0178] (4) 发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体饲用复合酶。

[0179] 所述调配过程加入浓缩酶液总重量 3% 中草药粉剂。

[0180] 经上述制备方法得到的发酵液发酵液粗酶液中含有多种酶活力，其中，蛋白酶活力 6700U/ml、甘露聚糖酶活力 1700U/ml、 $\alpha$ -半乳糖酶活力 1300U/ml、果胶酶活力 1200U/ml。

[0181] 所述香味麦芽酶制备方法如下：

[0182] (1) 麦芽回潮：用麦芽重量 4%，温度为 50℃温水均匀喷雾麦芽粒表面，置混合机中均匀混合 5min。

[0183] (2) 烘焙：将回潮麦芽装入转筒式炒炉，在 15min 内温度升至 200℃，保温 15min，然后降温至 110℃，保温 30min，最后取出摊凉，得到香味麦芽；

[0184] (3) 粉碎：将香味麦芽加入麦芽粉碎机粉碎，调整辊间距为 0.5mm，转速为 250rpm，得到香味麦芽粉；

[0185] (4) 超声、PEF 提取：将香味麦芽粉置于配料缸中，加入 6 倍的水，边缓慢搅拌边用探头式超声提取仪在电流强度 1.5A/W 条件下进行超声提取 15min；然后进行高压脉冲电场 (PEF) 提取 20min，电场强度 40kV/cm，脉冲时间 600 $\mu$ s，脉冲频率 300Hz；

[0186] (5) 过滤：将提取液于室温用 800 目滤布采用板框过滤机进行过滤，操作压力为 0.14-0.24MPa；

[0187] (6) 超滤浓缩：采用截留分子量 <100000 道尔顿的超滤膜循环浓缩，直至浓缩液酶含量为超滤前的 10-15 倍；

[0188] (7) 干燥：向浓缩液中加入浓缩液重量 5% 的本发明保护剂，然后用酶制剂专用喷雾干燥机干燥，进风温度 160℃，排风温度 85℃，干燥时间 15s，产品水分 < 5%，即得香味麦芽酶。

[0189] 所述中草药提取物的制备方法为：分别将中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加 6 倍重量的水，控制温度 90℃保持 4h，然后降温至 60℃，加入混合酶制剂进行酶解，用乳酸调节 pH 值为 6.8，酶解 4h，最后添加混合物料 3 倍重量乙醇和丙醇的混合物，控制温度至 78℃保持 4h，过滤；滤液减压浓缩至固形物含量为 20% 以上，然后冷冻干燥获得中草药提取物。

[0190] 所述中草药的重量份数组成为：沙棘 30 份，决明子 30 份，枸杞 15 份，山药 15 份，北沙参 10 份，黄荆子 10 份，玉竹 5 份，薏米 5 份，大麦芽 5 份，桂花 5 份，黄芪 5 份；

[0191] 混合酶添加量为混合物料总重量的 10%；

[0192] 所述混合酶的重量份数组成为：内  $\beta$ -葡聚糖酶 20 份，外  $\beta$ -葡聚糖酶 20 份， $\beta$ -葡萄糖苷酶 15 份，木聚糖酶 20 份，戊聚糖酶 20 份，普鲁兰酶 30 份， $\beta$ -淀粉酶 15 份，中性蛋白酶 15 份，酸性蛋白酶 15 份，超氧化物歧化酶 10 份，葡萄糖氧化酶 10 份，酸性磷酸酶 10 份；

[0193] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：海藻糖 30 份，NaCl 30 份， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15 份，半胱氨酸 15 份。

[0194] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 40 份，氯化钙 20 份，硫酸钠 20 份，氯化镁 10 份。

[0195] 本发明饲料复配酶的制备方法如上。

[0196] 实施例 4 饲用复合酶的热稳定性分析

[0197] 对饲用复合酶的热稳定性进行了分析，将实施例 3 粗酶液分别置于 30℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃下，每隔 10 分钟取样测定饲用复合酶中各组成酶的酶活。30℃、40℃、45℃、50℃下，60 分钟各组成酶酶活没有下降。55℃、60℃与 65℃下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 95%，60 分钟各组成酶酶活降到 85%。70℃下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 90%，60 分钟各组成酶酶活降到 85%。75℃下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 85%，60 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 80%，与现有技术相比，同样条件下达到同样酶活耐受温度平均提高了 5-10℃。

[0198] 实施例 5 饲用复合酶的 pH 稳定性分析

[0199] 对饲用复合酶酶的 pH 稳定性进行了分析，将实施例 3 粗酶液分别置于 pH 值 2.0、2.5、3.5、4.5、5.5、6.0、6.5、7.0 下，每隔 10 分钟取样测定饲用复合酶中各组成酶的酶活。粗酶液 pH 值 5.5、6.0、6.5、7.0 下，60 分钟各组成酶酶活没有下降。pH 值 4.5、3.5 下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 95%，60 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 85%。pH 值 2.5 下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 90%，60 分钟降到原有酶活的 85%。pH 值 2.0 下，30 分钟各组成酶酶活降到原有酶活的 85%，60 分钟降到原有酶活的 80%，与现有技术相比，同样条件下达到同样酶活耐 pH 值较宽泛。