

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710035472.0

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 101139560A

[22] 申请日 2007.7.30
[21] 申请号 200710035472.0
[71] 申请人 湖南农业大学
地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区湖南农业大学
共同申请人 长沙绿叶生物科技有限公司
[72] 发明人 黄兴国 杨承剑 李宗军 贺建华
黄 璜 文利新

[74] 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
代理人 颜 勇

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称
多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺及其发酵培养基

[57] 摘要
本发明提供了一种多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺及其发酵培养基。将德氏乳杆菌(保藏号 CCTCC M 207096)、枯草芽胞杆菌(保藏号 CCTCC M 207097)、奇异酵母(保藏号 CCTCC M 207098)分别接种至相应液体培养基中,37℃恒温培养 18~24 小时,再将各菌悬液按一定比例混合接种到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的固态发酵培养基中,30~34℃下发酵 36~48 小时,冻干即为饲用微生态制剂。本发明的生产工艺具有投资少、能耗低、产率高及无废液污染等优点,同时为啤酒糟的变废为宝开辟了新的途径。

1、一种多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺，其特征在于：包括以下步骤：

1) 制备种子液：将德氏乳杆菌，其保藏号为 CCTCC M 207096，枯草芽胞杆菌，其保藏号 CCTCC M 207097，奇异酵母，其保藏号 CCTCC M 207098，分别接种至 MRS 液体培养基、肉汤液体培养基、马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃下恒温培养 18~24 小时；

2) 制备发酵用固体培养基：按重量比将风干后啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1~2 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份粉碎，过 40 目筛后混合均匀，加入蒸馏水 100~120 份，充分拌匀后 121℃下高压灭菌 15 分钟，冷却至室温备用；

3) 固态发酵：将步骤 1) 制备的三种菌种子液按体积比 1~2: 1~2: 1~2 混合后，以 10%~15% V/W 的接种量将混合菌液加入到已灭菌的啤酒糟培养基中，30~34℃下发酵 36~48 小时，制得发酵产物；

4) 将发酵产物进行真空冷冻干燥并粉碎，即制得饲用微生态制剂。

2、根据权利要求 1 所述一种多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺，其特征在于：固态发酵中，将制备德氏乳杆菌、枯草芽胞杆菌、奇异酵母种子液按体积比 1~2: 1~2: 1~2 混合。

3、一种用于多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的发酵培养基，其特征在于：将以下物质风干后按重量比配制而成：啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1~2 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份粉碎，加入蒸馏水 100~120 份。

多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺及其发酵培养基

技术领域

本发明涉及饲料工业和畜牧养殖业领域，具体涉及饲料添加剂中饲用微生态制剂的生产工艺及其发酵培养基。

背景技术

饲用微生态制剂是采用已知有益微生物，经培养、发酵、干燥、加工等特殊工艺制成的含有活菌并用于动物饲养的生物制剂或活菌制剂，属于营养保健类饲料添加剂，在保持动物体内优势菌群和微生态平衡、减少肠道有害产物和圈舍臭味方面发挥着重要作用。

一般来说，微生态制剂的生产工艺可分为固态发酵和液态发酵两种。液态发酵是指发酵的介质为液体的发酵过程，具有发酵周期短、生产规模大、产量高、可以进行工业化连续生产等优点，但同时存在贮藏不便、技术难度大，投资大等不足。

目前我国啤酒糟年产量已达1000多万吨，并且还有不断增加的趋势。啤酒糟养分含量较高，其中粗蛋白含量高达28%，此外还含有丰富的氨基酸、维生素和多种微量元素等。然而啤酒糟极易腐败变质，若不及时处理将会导致严重的环境污染。因此利用微生物处理啤酒糟是发展生态农业，合理使用资源、有效保护环境的可持续发展道路。目前国内外利用啤酒糟生产饲料蛋白的报道较多，但迄今为止未有多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂方面的相关报道。

发明内容

本发明的目的在于克服现有制备饲用微生态制剂方法存在的诸多不足，提供一种多菌固态发酵啤酒糟生产饲用微生态制剂的工艺。

本发明的另一目的旨在提供上述工艺使用的发酵培养基。

本发明的目的通过以下技术方案实现：

1) 制备种子液：将德氏乳杆菌（保藏号 CCTCC M 207096）、枯草芽胞杆菌（保藏号 CCTCC M 207097）、奇异酵母（保藏号 CCTCC M 207098）分别接种至 MRS 液体培养基、肉汤液体培养基、马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃ 下恒温培养 18~24 小时；

2) 制备发酵用固体培养基：按重量比将风干后啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1.0~2.0 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份，粉碎，过 40 目筛后混合均匀，加入蒸馏水 100~120 份，充分拌匀后 121℃ 下高压灭菌 15 分钟，冷却至室温备用；

3) 固态发酵：将步骤 1) 制备的三种菌种子液以 10%~15% (V/W) 的接种量将混合菌液加入到已灭菌的啤酒糟培养基中，30~34℃ 下发酵 36~48 小时，制得发酵产物；

4) 将发酵产物进行真空冷冻干燥，即制得饲用微生态制剂。

所述的固态发酵中制备的三种菌德氏乳杆菌、枯草芽胞杆菌、奇异酵母的种子液按体积比 1~2: 1~2: 1~2 混合。

本发明的工艺所得到的微生态制剂呈黄褐色粉状，含水量 $\leq 10\%$ ，含有益活菌总数 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中德氏乳杆菌 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，枯草芽胞杆菌 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，奇异酵母 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ 。

本发明的优点在于：

1) 本发明首次采用多菌固态发酵工艺生产饲用微生态制剂，不涉及特殊的搅拌及通气系统，生产设施简单，能耗低且发酵流程容易控制，对于降低饲用微生态制剂的生产成本具有十分重要的意义；

2) 本发明的固态发酵工艺具有将菌体及其代谢产物和底物全部利用的特点，既保留活性成分又没有废弃物污染之忧；

3) 本发明所用培养基主要为啤酒酿造工业的副产品——啤酒糟，其来源

丰富、价格低廉、易于干燥，生产成本低，可以因地制宜发展。

具体实施方式

实施例 1:

1、三种菌的保藏情况:

D、E、F 三种菌已在中国典型培养物保藏中心保藏，保藏日期均为 2007 年 3 月 16 日。

CCTCC 保藏号	菌株号	菌种名称
CCTCC M 207096	菌株 D	德氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus delbrueckii</i>)
CCTCC M 207097	菌株 E	枯草芽胞杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
CCTCC M 207098	菌株 F	奇异酵母 (<i>Saccharomyces paradoxus</i>)

德氏乳杆菌属于乳杆菌，枯草芽胞杆菌属于芽胞杆菌;奇异酵母属于酵母。

2、D、E、F 三种菌的形态、生理生化及代谢特征:

菌株 D 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	+	β -半乳糖苷酶	+/-	D-阿拉伯醇	-
细胞形状	长杆状	龙胆二糖	-	D-纤维二糖	-
细胞直径 $>1.0\mu\text{m}$	+	α -D-乳糖	-	D-果糖	+
形成内生孢子	+	麦芽糖	+/-	墨角藻糖	+
芽孢形成	偏端生	鼠李糖	-	利用柠檬酸盐	+
孢囊膨大	-	D-松三糖	-	硝酸盐还原	-
芽孢形状	卵圆形	D-密二糖	-	D-半乳糖	-
伴孢晶体	-	D-阿洛酮糖	-	核糖	+
接触酶	-	D-棉籽糖	-	丙酮酸甲基	-
氧化酶	-	水杨苷	-	琥珀酸甲基	+
淀粉水解	+	七叶苷	-	丙酸	+
D-葡萄糖	+	D-山梨糖	+	丙酮酸	+
D-木糖	-	蔗糖	+	琥珀酸	-
L-阿拉伯糖	-	D-海藻糖	+/-	L-丙氨酸	+/-
D-甘露醇	-	木糖醇	+	甘油	+/-
D-甘露糖	+	乙酸	+	m-肌醇	+/-
吐温 80	+	α -羟基丁酸	+/-	β -羟基丁酸	+/-
明胶	-				

菌株 E 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	+	β -半乳糖苷酶	+/-	D-阿拉伯醇	-
细胞形状	长杆状	龙胆二糖	+	D-纤维二糖	+
细胞直径 $>1.0\mu\text{m}$	+	α -D-乳糖	-	D-果糖	+
形成内生孢子	+	麦芽糖	+	墨角藻糖	-
芽胞形成	偏端生	鼠子糖	-	利用柠檬酸盐	+
孢囊膨大	-	D-松三糖	+	硝酸盐还原	-
芽胞形状	卵圆形	D-蜜二糖	+	D-半乳糖	-
伴孢晶体	-	D-阿洛酮糖	+	核糖	+
接触酶	+	D-棉籽糖	-	丙酮酸甲基	+
淀粉水解	+	水杨苷	+	琥珀酸甲基	+
明胶液化	+	七叶苷	+	丙酸	-
D-葡萄糖	+	D-山梨糖	+/-	丙酮酸	+
D-木糖	+	蔗糖	+	琥珀酸	+
L-阿拉伯糖	-	D-海藻糖	+	L-丙氨酸	+
D-甘露醇	+/-	木糖醇	-	甘油	+
D-甘露糖	+	乙酸	-	m-肌醇	+
吐温 80	+	α -羟基丁酸	-	β -羟基丁酸	+
明胶	+				

菌株 F 的形态、生理生化及代谢特征

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
菌苔生长	圆形、凸起	l-赤藻糖醇	-	D-蜜二糖	-
表面颜色	白色	麦芽三糖	+	α -D-葡萄糖	+
状态	光滑	D-松三糖	+/-	D-甘露醇	+/-
边缘	全缘	核糖醇	-	水苏糖	+/-
细胞形态	椭圆形	D-甘露糖	+	龙胆二糖	-
繁殖方式	芽殖	D-甘露醇	+/-	松二糖	+/-
假菌丝	-	D-棉籽糖	+/-	N-乙酰-D-葡萄糖胺	+/-
可溶性淀粉	+/-	L-鼠李糖	-	山梨醇	-
吐温 80	-	蔗糖	+	乙酸	-
L-阿拉伯糖	-	山梨醇	-	甘油	+/-
麦芽糖	+/-	D-核糖	-	尿素	-
D-山梨糖	-	D-木糖	-	1,5-酮戊二酸	-
D-半乳糖	+/-	D-海藻糖	-	L-亮氨酸	-
D-阿拉伯醇	-	乙酸	-	L-天冬氨酸	-
D-纤维二糖	-	琥珀酸	-	水杨苷	-

3、发酵用固体培养基的制备：

按重量比将风干后啤酒糟 100 份、麸皮 10~15 份、葡萄糖 3~5 份、豆渣 5~8 份、尿素 1~2 份、硫酸铵 0.5~1.0 份、磷酸二氢钾 0.5~1 份、硫酸镁 0.2~0.3 份、硫酸锰 0.2~0.3 份、氯化钙 0.2~0.3 份粉碎，过 40 目筛后混合均匀，加入蒸馏水 100~120 份，充分拌匀后 121℃下高压灭菌 15 分钟，冷却至室温备用。

4、多菌固态发酵：

将 D、E、F 菌分别从试管斜面上各取一环菌苔接种至 50mlMRS 液体培养基、50ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃恒温培养 18 小时，然后将各菌悬液按 1: 2: 1 (D 菌: E 菌: F 菌) 体积混合，按 10% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 30℃下发酵 36 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量≤10%；含有益活菌总数 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中 D 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，E 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，F 菌含量为 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ 。

实施例 2：

其它同实施例 1。将 D、E、F 菌分别从试管斜面上取一环菌苔接种至 50mlMRS 液体培养基、50 ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃恒温培养 21 小时，然后将各菌悬液按 2:1:2 (D 菌: E 菌: F 菌) 的体积比混合，按 12% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 32℃下发酵 42 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量≤10%；含有益活菌总数 $9 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，其中 D 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，E 菌含量为 $4 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU/g}$ ，F 菌含量为 $1 \times 10^8 \text{CFU/g} \sim$

1×10^{10} CFU/g。

实施例 3:

其它同实施例 1。将 D、E、F 菌分别从试管斜面上取一环菌苔接种至 50ml MRS 液体培养基、50 ml 肉汤液体培养基、50ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中，37℃ 恒温培养 24 小时，然后将各菌悬液按 1: 1: 2 (D 菌: E 菌: F 菌) 的体积比混合，按 15% (V/W) 的比例加入到已灭菌的以啤酒糟为主要原料的培养基中，混合均匀，然后在 34℃ 下发酵 48 小时，再经过冷冻干燥后即可。

最终产物的理化特征及生物性质：黄褐色，粉状；含水量 $\leq 10\%$ ；含有益活菌总数 9×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，其中 D 菌含量为 4×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，E 菌含量为 4×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g，F 菌含量为 1×10^8 CFU/g $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/g。

实施例 4 :

本发明所研制的微生态制剂在湖南网岭园艺场工厂化猪场以 0.1% 的比例应用于 84 头初始体重 20kg 左右的生长猪的日粮当中，试验期为 28 天，试验结果表明，与抗生素组（吉它霉素和土霉素）相比，本发明所研制的微生态制剂有利于降低生长猪的料肉比，平均降低了 0.34，而腹泻率则降低了 4.94%，日粮中粗脂肪和粗纤维的利用率分别提高了 4.54%、5.33%，猪粪样中的大肠杆菌显著降低，降低幅度为 0.63×10^7 CFU/g，同时乳酸菌和双歧杆菌数量都分别提高了 4.87×10^7 、 0.7×10^7 CFU/g。

实施例 5:

本发明所研制的微生态制剂在湖南农科院种猪场以 0.3% 的比例应用于 60 头初始体重为 10kg 左右的断奶仔猪的日粮当中，试验期为 28 天，试验结果表明，与抗生素组（金霉素）相比，本发明所研制的微生态制剂有利于提高

仔猪的生长性能,降低其料肉比,平均降低了 0.22,而腹泻率则降低了 3.16%,粗蛋白、粗脂肪、粗纤维的利用率分别提高了 2.86%、4.25%、4.14%,仔猪粪样中的大肠杆菌降低幅度为 0.44×10^7 CFU/g,同时乳酸菌和双歧杆菌数量都有升高,其升高幅度分别为 3.04×10^7 、 1.42×10^7 CFU/g。