



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104585510 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201510077418. 7

(22) 申请日 2015. 02. 13

(71) 申请人 秦皇岛高通生物科技有限公司

地址 066600 河北省秦皇岛市昌黎县昌黎镇
八里庄(金榭巴黎 9 栋 3 单元 903 号)

(72) 发明人 丁志勇 张琳

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 李桂存

(51) Int. Cl.

A23K 1/16(2006. 01)

C12N 1/14(2006. 01)

C12R 1/645(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种混菌发酵物饲料添加剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种混菌发酵物饲料添加剂及其制备方法,属于微生物发酵领域,该混菌发酵物是由朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成,该混菌发酵物饲料添加剂的制备方法为首先通过母种培育、然后经菌种瓶培养、发酵罐发酵,即得混菌发酵物饲料添加剂。本发明制备的混菌发酵物饲料添加剂天然,安全绿色,营养价值高,且能预防疾病,提高畜禽免疫力且无药物残留。本发明提供的制备方法培养液配方简单,发酵产率高、产品质量好。

1. 一种混菌发酵物饲料添加剂,其特征在于,所述混菌发酵物为朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成。

2. 根据权利要求1所述的混菌发酵物饲料添加剂,其特征在于:所述混菌发酵物饲料添加剂的添加量为占动物饲料重量的0.1-0.2%。

3. 一种如权利要求1所述的混菌发酵物饲料添加剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 母种培育:将朱红栓菌和北虫草原种取 1cm^3 分别接种到试管斜面培养基中,25℃活化7天后,母种备用;

所述斜面培养基为PDA培养基;

b. 静置培养:分别取 1cm^3 母种菌块,分别接种到装有1cm厚度PDA培养基的菌种瓶中,25℃下静置培养7天;

c. 液态培养:培养结束后,向上述盛有朱红栓菌和北虫草的菌种瓶中,分别注入500ml液体培养基,25℃通气培养5天,得液态菌种;

d. 将上述两种液态菌种各500ml同时接种到装有10L液体培养基的10L发酵罐中,25℃通气混合培养5天;

e. 将上述混合培养的菌种全部转入装有100L液体培养基的100L发酵罐中,25℃通气混合培养5天;

f. 将100L发酵罐中混合培养的菌种全部转入装有1000kg液体培养基的1000kg发酵罐中,25℃通气混合培养10天;

所述操作过程均为在无菌条件下进行;

所述通气为通入经无菌过滤的洁净空气,通气量均为每升培养基0.1-0.3L。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述PDA培养基的制备方法为:200g马铃薯煮烂过滤,向滤液中加入20g葡萄糖,3g KH_2PO_4 ,1.5g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,50-100mg 维生素 B_1 ,补水至1000mL,加20g琼脂,加热融化后,121℃灭菌30min即可。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述菌种瓶的瓶口塞上有两个直径5mm圆孔,其中一圆孔用外径5mm不锈钢管通入瓶底,不锈钢管另一端链接通入空气的空气过滤器;另一圆孔链接用于排气的空气过滤器,并整体经121℃灭菌30min。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述液体培养基配方为:蛋白胨1%,葡萄糖2%,玉米淀粉1%,磷酸二氢钾0.1%,硫酸镁0.05%,维生素 B_1 0.01%,消泡剂0.02%,余量为水;PH值为6.5。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述液体培养基的制备方法为:称取配方质量的玉米淀粉加水溶解,然后加热至沸腾,搅拌糊化后加入蛋白胨、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素 B_1 、消泡剂,搅拌均匀,121℃灭菌30min即可。

8. 根据权利要求6-7任一项所述的制备方法,其特征在于:所述消泡剂是由蔗糖脂肪酸酯、羟甲基纤维素钠组成,所述蔗糖脂肪酸酯、羟甲基纤维素钠质量比为1:1。

一种混菌发酵物饲料添加剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种饲料添加剂,特别涉及一种混菌发酵物饲料添加剂及其制备方法,属于微生物发酵领域。

背景技术

[0002] 混菌发酵是指两种或两种以上的微生物的协同作用共同完成某一发酵过程的新型发酵技术。混菌发酵具有能够获取某些纯种无法得到的产物,且混菌之间互利共栖协同作用,可能大于单独发酵混合后的累加效应,生长速度快,提高产率,发酵物利用率高等优点。

[0003] 药用真菌具有 2000 多年的发展史,具有保健和治疗作用的自然资源。药用真菌多属于担子菌亚门和子囊菌亚门,种类繁多,形态各异,大多是由菌丝体和子实体两大部分组成。

[0004] 真菌与真菌的混菌发酵物在畜禽健康养殖、促进畜禽免疫力提高等方面起到了重要作用。随着畜牧业的发展,抗生素类药物滥用现象明显,导致病菌耐药性增强,动物体内药物残留,严重影响了人类健康。药用真菌混菌发酵产物作为饲料添加剂,解决化学药物添加剂的使用产生的耐药性和药物残留问题。现有技术中,多采用单一菌种进行发酵制备饲料添加剂,产率低且效果不理想。中国专利 CN101480226A 公开了一种蝙蝠蛾拟青霉发酵物饲料添加剂及其制备方法,该饲料添加剂制备过程中采用摇瓶培养,无法直观的观察菌种的生长情况,菌种生长速度慢,且该发明中所使用的培养基易生成菌球,产率低。目前,尚未有关于朱红栓菌和北虫草混菌发酵的报道。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种利用朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成的混菌发酵物饲料添加剂,该添加剂天然,安全绿色,营养价值高,且能预防疾病,提高畜禽免疫力且无药物残留。

[0006] 本发明还提供了一种混菌发酵物饲料添加剂的制备方法,该方法能够菌种污染小,通过科学的配比各培养基,发酵产率高,制备的产物结构均匀。

[0007] 本发明为了实现上述目的所采用的技术方案为:

一种混菌发酵物饲料添加剂,所述混菌发酵物为朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成。

[0008] 上述混菌发酵物饲料添加剂的添加量为占动物饲料重量的 0.1-0.2%。

[0009] 本发明还提供了一种混菌发酵物饲料添加剂的制备方法,包括以下步骤:

a. 母种培育:将朱红栓菌和北虫草原种取 1cm³分别接种到试管斜面培养基中,25℃活化 7 天后,母种备用;

所述斜面培养基为 PDA 培养基;

b. 静置培养:分别取 1cm³母种菌块,分别接种到装有 1cm 厚度 PDA 培养基的菌种瓶中,25℃下静置培养 7 天;

c. 液态培养:培养结束后,向上述盛有朱红栓菌和北虫草的菌种瓶中,分别注入 500ml 液体培养基,25℃通气培养 5 天,得液态菌种;

d. 将上述两种液态菌种各 500ml 同时接种到装有 10L 液体培养基的 10L 发酵罐中,25℃通气混合培养 5 天;

e. 将上述混合培养的菌种转入装有 100L 液体培养基的 100L 发酵罐中,25℃通气混合培养 5 天;

f. 将上述混合培养的菌种转入装有 1000kg 液体培养基的 1000kg 发酵罐中,25℃通气混合培养 10 天;

上述操作过程均为在无菌条件下进行;

上述通气为通入经无菌过滤的洁净空气,通气量均为每升培养基 0.1-0.3L。

[0010] 本发明混菌发酵物饲料添加剂的制备方法中,所述 PDA 培养基的制备方法为:200g 马铃薯煮烂过滤,向滤液中加入 20g 葡萄糖,3g KH_2PO_4 ,1.5g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,50-100mg 维生素 B_1 ,补水至 1000mL,加 20 g 琼脂,加热融化后,121℃灭菌 30min 即可。

[0011] 本发明混菌发酵物饲料添加剂的制备方法中,所述菌种瓶的瓶口塞上有两个直径 5mm 圆孔,其中一圆孔用外径 5mm 不锈钢管通入瓶底,不锈钢管另一端链接通入空气的空气过滤器;另一圆孔链接用于排气的空气过滤器,并整体经 121℃灭菌 30min。

[0012] 本发明混菌发酵物饲料添加剂的制备方法中,所述液体培养基配方为:蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,玉米淀粉 1%,磷酸二氢钾 0.1%,硫酸镁 0.05%,维生素 B_1 0.01%,消泡剂 0.02%,余量为水;PH 值为 6.5。

[0013] 上述液体培养基的制备方法为:称取配方质量的玉米淀粉加水溶解,然后加热至沸腾,搅拌糊化后加入蛋白胨、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素 B_1 、消泡剂,搅拌均匀,121℃灭菌 30min 即可。

[0014] 本发明混菌发酵物饲料添加剂的制备方法中,所述消泡剂是由蔗糖脂肪酸酯、羟甲基纤维素钠组成,所述蔗糖脂肪酸酯、羟甲基纤维素钠质量比为 1:1。

[0015] 本发明中朱红栓菌和北虫草原种均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

[0016] 本发明发明人通过大量组合试验,选择两种有不同功能性作用的药用真菌,混菌发酵,采用液体深层发酵的方法,采用的药用真菌品种为朱红栓菌和北虫草,其中朱红栓菌具有清热除湿、解毒、消炎的功效,北虫草有抗病毒,提高机体免疫力、抗氧化、调节肠道的作用,两者功能互补,协同配合,并且在混菌发酵过程中产生的发酵代谢产物,能够提高动物机体的免疫力,预防疾病且具有很好的保健作用。

[0017] 本发明混菌过程中使用的菌种瓶,由于采用了小气量通气培养,与摇床相比,菌种的生长速度更快,且瓶子是透明的,能直观的观察菌种的发育状况,一旦发现有杂菌污染的瓶子,马上放弃,所以能最大限度减少后续培养的菌种的污染问题。

[0018] 本发明通过科学合理的配置培养液,配方简单,原料易得。本发明中,混菌体系菌种的选择是混菌发酵成功的关键因素,发明人通过大量试验,得出最佳的混菌体系菌种,两种菌种混菌发酵有增强作用,提高发酵效率及产量。本发明中玉米淀粉的添加量是控制菌丝生长的重要因素,通过合理的添加玉米淀粉,产生的菌丝多,结构均匀,玉米淀粉添加量过多,则对菌丝的生长具有抑制作用,过少则导致菌丝生长势减弱,且玉米淀粉较传统的玉米粉、黄豆粉,能够有效地防止菌球的生成,提高产率及产品质量。

[0019] 本发明通过合理的设计发酵时间及发酵过程中的温度、通气量等参数,合理的添加菌种量,使得菌丝的质量可控,性能稳定。发酵时间过短或过长,均容易导致产量的下降。

[0020] 本发明制备的混菌发酵物饲料添加剂具有高生物活性,本发明经过大量的摸索实验,最终确定了优化的添加量,添加量过多造成资源的浪费,过少则作用效果不强,本发明公开的混菌发酵物的添加量合理均衡,效果好。

[0021] 本发明的优点及有益效果为:

1. 本发明制备的混菌发酵物饲料添加剂天然,安全绿色,营养价值高,能预防疾病,提高畜禽免疫力且无药物残留。

[0022] 2. 本发明使用特制的菌种瓶,能够加快菌种的生长速度,减少后续培养菌种的污染问题,避免人力物力的浪费。

[0023] 3. 本发明的培养液配方简单,原料易得,制备过程中通过科学合理的控制发酵温度、时间等工艺参数,制备得到的产物生长势好,产率高且质量佳。

具体实施方式

[0024] 以下结合实施例的具体实施方式再对本发明的上述内容作进一步的详细说明,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实施例。在不脱离本发明上述技术思想情况下,根据本领域普通技术知识和惯用手段做出的各种替换或变更,均包括在本发明的范围内。

[0025] 一、混菌体系的组合实验:

用 101 发酵罐三个,分别接种朱红栓菌、北虫草、朱红栓菌-北虫草混菌体系,25 度,培养 5 天,分别测定胞外多糖和胞内多糖产量,多糖的测量方法采用蒽酮-硫酸法,测定结果见表 1。

[0026] 表 1:

菌种名称	朱红栓菌	北虫草	朱红栓菌-北虫草混菌体系
胞外多糖含量 (g/l)	0.26	0.858	1.158
胞内多糖含量 (g/l)	0.437	0.909	1.411

从表 1 中可以看出,混菌体系胞外多糖和胞内多糖产量均大于单菌发酵,证明本发明所选用的两种菌种在混菌体系有很好的协同增效作用,所以,采用朱红栓菌-北虫草混菌体系发酵,产量高且提高发酵效率。

[0027] 实施例 1

一种混菌发酵物饲料添加剂,混菌发酵物为朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成。

[0028] 一种混菌发酵物饲料添加剂的制备方法,具体包括以下步骤:

a. 母种培育:将朱红栓菌和北虫草原种取 1cm³分别接种到斜面培养基中,活化 7 天后母种备用;

所述斜面培养基为 PDA 培养基;

b. 静置培养:分别取 1cm³母种菌块,分别接种到装有 1cm 厚度 pda 培养基的菌种瓶中,

25℃下静置培养 7 天；

所述菌种瓶的瓶口塞上有两个直径 5mm 圆孔,其中一圆孔用外径 5mm 不锈钢管通入瓶底,不锈钢管另一端链接通入空气的空气过滤器;另一圆孔链接用于排气的空气过滤器,并整体经 121℃灭菌 30min。

[0029] c. 液态培养:培养结束后,向上述盛有朱红栓菌和北虫草的菌种瓶中,分别注入液体培养基,25℃通气培养 5 天,得液态菌种;

d. 将上述两种液态菌种同时接种到装有 10L 液体培养基的 10L 发酵罐中,25℃通气混合培养 5 天;

e. 将上述混合培养的菌种转入装有 100L 液体培养基的 100L,25℃通气混合培养 5 天;

f. 将上述混合培养的菌种转入装有 1000kg 液体培养基的 1000kg,25℃通气混合培养 10 天;

所述操作过程均为在无菌条件下进行;

所述通气为通入经无菌过滤的洁净空气。

[0030] PDA 培养基的制备方法为:200g 马铃薯煮烂过滤,向滤液中加入 20g 葡萄糖,3g KH_2PO_4 ,1.5g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,50-100mg 维生素 B_1 ,补水至 1000mL,加 20 g 琼脂,加热融化后,121℃灭菌 30min 即可。

[0031] 上述液体培养基配方为:蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,玉米淀粉 1% (玉米淀粉应先加 2 倍水溶解,然后加热至沸腾,搅拌糊化即可),磷酸二氢钾 0.1% 硫酸镁 0.05%,vb1 0.01%,消泡剂 0.02%;PH 值为 6.5。

[0032] 实施例 2 (使用玉米粉代替玉米淀粉)

一种混菌发酵物饲料添加剂,混菌发酵物为朱红栓菌和北虫草混菌发酵而成。

[0033] 一种混菌发酵物饲料添加剂的制备方法同实施例 1 相同,不同的为液体培养基,液体培养基配方为:蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,玉米粉 1%,磷酸二氢钾 0.1% 硫酸镁 0.05%,vb10.01%,消泡剂 0.02%;PH 值为 6.5。

[0034] 实施例 3 (朱红栓菌发酵物饲料添加剂)

纯种培养,朱红栓菌发酵物饲料添加剂,方法同实施例 1 相同。

[0035] 实施例 4 (北虫草发酵物饲料添加剂)

纯种培养,北虫草发酵物饲料添加剂,方法同实施例 1 相同。

[0036] 效果实施例 1 发酵物对肉鸡生长的影响

1. 实验动物:选择 1 日龄肉鸡 5000 只,公母各半,随机分为 5 组,每组 1000 只,分栏饲养。

[0037] 2. 饲养饲料:5 组分别编号 S1、S2、S3、D1、D2, S1-S2 分别喂食添加有实施例 1 和 2 制备的饲料添加剂的饲料,添加量均为 0.1%,不添加其他任何抗大肠杆菌类抗生素;S3 喂食同时添加有实施例 3 和 4 制备的饲料添加剂的饲料,添加量分别为 0.05%,不添加其他任何抗大肠杆菌类抗生素,共 0.1%;D1 按常规量正常添加抗生素;D2 只喂养饲料,无添加任何饲料添加剂和抗生素类药物。

[0038] 其他日常管理方式均相同。

[0039] 30 天后对肉鸡进行称重,观察饲料添加剂对肉鸡生长的影响,具体结果见表 2。

[0040] 表 2

	初重 (g/只)	30 日龄重 (g/只)	日增重 (g)	肉料比	死亡率 (%)
S1	39.3	1985.5	67.1	1.35	0.5
S2	40.1	1810.6	61.1	1.41	1.1
S3	40.6	1792.5	60.4	1.45	0.9
D1	38.9	1732.9	58.4	1.47	0.8
D2	39.8	1681.4	56.6	1.52	2.5

从表 2 中可以看出,应用本发明提供的混菌发酵物饲料添加剂肉鸡肉料比少,但日增重最大,经济效益好。且 S1 组同 D1、D2 组相比较,肉鸡粪便成型的圆锥状,随机对 S1 组的鸡解剖发现,肠壁绒毛完整,对照物 D1 鸡粪便含水分过多,粪便稀薄,分析原因为长期服用抗生素导致其消化功能紊乱。S1 组中肉鸡的日增重也明显大于 S3。S4 实验组累加的饲料添加剂组的重量,日增重增加约 11.1%,说明混菌发酵物饲料添加剂比单独纯菌发酵物饲料添加剂效果好,能够提高饲料中营养物质的消化率和代谢能,提高肉鸡的免疫力,减少死亡率,从而降低饲养成本,提高经济效益,且混菌发酵能够节约资源,减少发酵时间,提高效率。

[0041] 效果实施例 2 发酵物添加剂对产蛋鸡的影响

1. 实验动物:选择 150 日龄产蛋鸡 6000 只,随机分为 2 组,实验组及对照组,每组 3000 只,分栏饲养。

[0042] 2. 饲养饲料:实验组喂食添加有实施例 1 制备的饲料添加剂的饲料,添加量均为 0.1%,不添加其他任何抗大肠杆菌类抗生素;对照组喂食按常规量正常添加抗生素。两组均连续使用 10 天。

[0043] 其他日常管理方式均相同。

[0044] 3. 结果分析:实验组产蛋鸡的蛋壳颜色红润,有光泽,沙皮蛋数量较对照组减少约 21%;蛋重较对照组增加 16.3%。

[0045] 效果实施例 3 发酵物对仔猪生化指标及免疫机能的影响

1. 实验动物:选择 120 日仔猪,随机分为 3 组, S1、S2、D1,分栏饲养。

[0046] 2. 饲养饲料:实验组 S1 喂食添加有实施例 1 制备的饲料添加剂的饲料,添加量均为 0.1%,实验组 S2 喂食添加有实施例 1 制备的饲料添加剂的饲料,添加量均为 0.2%,不添加其他任何抗大肠杆菌类抗生素;对照组 D1 不添加饲料添加剂。

[0047] 其他日常管理方式均相同。

[0048] 随机从各组抽取 5 头猪,取猪血,仔猪血液生化指标及免疫机能的分析结果见表 3。

[0049] 表 3

项目	空白组	S1(0.1%)	S2(0.2%)
总蛋白 (TP) (g. L ⁻¹)	52.5853±1.6852b	61.2466±0.9413a	62.7906±0.5052a
白蛋白 (ALB) (g. L ⁻¹)	42.342±3.235	43.7588±2.5325	43.9965±3.4465
球蛋白 (GLO) (g. L ⁻¹)	16.2643±0.5631b	18.8506±0.7508a	21.7468±0.8345a
免疫球蛋白 G (IgG) (g. L ⁻¹)	0.4463±0.01654b	0.4865±0.01631a	0.5135±0.0165a
免疫球蛋白 A (IgA) (g. L ⁻¹)	6.0321±0.4145B	6.4469±0.0692AB	6.6957±0.2125A
免疫球蛋白 M (IgM) (g. L ⁻¹)	1.2304±0.0434b	1.3765±0.0335b	1.8578±0.1210a

从表 3 中可以看出,血清 TP、ALB 和 GLO 的含量与对照组相比,其中各试验组的血清 ALB 含量与对照组相比不显著($P > 0.05$),而试验组的血清 TP 和 GLO 含量与对照组相比差异均达显著水平($P < 0.05$)。血清 IgG、IgA 和 IgM 的测定结果与空白组相比,各组 IgG 含量与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$);而 0.1% 组的 IgM 含量与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$);IgA 在各组间有极显著的差异($P < 0.01$),0.1% 组和 0.2% 组分别比对照组提高 10.75% 和 14.69%。

[0050] 结果表明,喂食添加有本发明提供的混菌发酵物饲料添加剂能显著的提高动物的免疫机能,提高动物机体的抵抗力。