



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109463531 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201811617718.X

C12R 1/01(2006.01)

(22)申请日 2018.12.28

C12R 1/645(2006.01)

(71)申请人 江苏中兴药业有限公司

地址 212143 江苏省镇江市丹徒高新技术
产业园冷遹路86号

(72)发明人 武俊明 陈华友 魏云 王夕雯

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51)Int.Cl.

A23K 10/12(2016.01)

A23K 10/37(2016.01)

C12P 1/02(2006.01)

C12P 1/04(2006.01)

C12R 1/07(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法及其
应用

(57)摘要

本发明公开了一种水飞蓟粕微生物饲料的
制备方法及应用,将水飞蓟粕添加酸性蛋白酶,
纤维素酶,木聚糖酶,甘露聚糖酶, α -半乳糖苷
酶, β 葡聚糖酶,植酸酶,再添加磷酸氢钙,搅拌
均匀,经芽孢杆菌和酵母菌一期发酵,然后添加
乳酸菌、双歧杆菌在单向膜厌氧袋中再经二期厌
氧发酵成微生物饲料成品;不仅增加了活菌含
量;其制备原料无需进行灭菌,制备产品无需进
行干燥处理,降低生产成本;并且微生物饲料成
品中含有丰富的活菌、酶群、维生素、脂类、有机
酸、氨基酸、各种寡糖及辅酶因子、小肽等功能物
质,且杂菌少,饲用效果明显;提高饲料利用率;
并有效提高饲喂对象免疫力和抵抗力,代替抗生
素的使用,进一步改善动物产品品质,消除栏舍
恶臭,生态效益明显。

1. 一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 一期固态发酵:将复合水飞蓟粕添加2-200g/t的纤维素酶(酶活力为1万u/g),6-200g/t的木聚糖酶(酶活力为18万u/g)、1-20g/t的甘露聚糖酶(酶活力为1万u/g)、3-300g/t的 α -半乳糖苷酶(酶活力为500u/g)、1-200g/t的酸性蛋白酶(酶活力为6万u/g)、1-200g/t的 β 葡聚糖酶(酶活力为5万u/g)、1-100g/t的植酸酶(酶活力为10万u/g)以及以质量计算0.05-0.5%的磷酸氢钙制备成复合水飞蓟粕混合物;以复合水飞蓟粕混合物为原料,接种混合芽孢杆菌液体菌种和混合酵母菌液体菌种,两种菌种的接种量均为0.1%-10%;接种后充分搅拌,28-38℃通气发酵12-36h,得一期固态发酵半成品;其中所述复合水飞蓟粕以质量计算包括10%-50%的水飞蓟粕、10%-30%的醋渣或酒渣、32%-50%的水;

(2) 二期固态发酵:将混合乳酸菌种子液与双歧杆菌种子液按照1:(1-4)混合后,接种到一期固态发酵半成品上,接种量为0.1%-12%;充分搅拌,装入单向膜厌氧袋,常温下进行二期厌氧发酵2周以上后即可得到所需水飞蓟粕微生物饲料。

2. 根据权利要求1所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述混合芽孢杆菌液体菌种的培养方法为:无菌条件下分别将4℃保存的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、纳豆杆菌各接一环至芽孢杆菌斜面培养基中,30-37℃培养16-36h复苏菌种;再在芽孢杆菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到芽孢杆菌摇瓶种子培养基中,装液量100-300mL/L三角瓶,150-240r/min,28-38℃,培养16-24h,再以以质量计1-10%的接种量混合接种到200L的芽孢杆菌种子罐培养基中进行扩大培养,150-240r/min,通气量为20-50L/min,培养16-24h后制得复合芽孢杆菌液体菌种。

3. 根据权利要求2所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:所述芽孢杆菌斜面培养基和平板培养基的制备方法如下:蛋白胨10g,牛肉膏粉5g,氯化钠5g,琼脂15g,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL,最终pH为7.0 \pm 0.2;110-121℃灭菌20-30min;

所述芽孢杆菌摇瓶种子培养基和芽孢杆菌种子罐培养基的制备方法如下:牛肉膏5.0g/L,蛋白胨20.0g/L,葡萄糖5.0g/L,FeCl₂·6H₂O 0.07g/L,MnCl₂·7H₂O 0.01g/L,MgSO₄·7H₂O 0.15g/L,pH 6.5-7.0,110-121℃灭菌20-30min。

4. 根据权利要求1所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述混合酵母菌液体菌种的培养方法为:无菌条件下分别将4℃保存的酵母菌菌种啤酒酵母,热带假丝酵母分别接一环至酵母菌斜面培养基中,28-38℃培养24-48h复苏菌种;再挑单菌落各在酵母菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到酵母菌摇瓶种子培养基,装液量为每L三角瓶装液100-300mL,150-240r/min,28-38℃,培养24-48h,再以以质量计算1-10%的接种量混合接种到200L的酵母菌种子罐培养基种进行扩大培养,150-240r/min,通气量为20-50L/min,培养24-48h后制得复合酵母菌液体菌种。

5. 根据权利要求4所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:所述酵母菌斜面培养基和酵母菌平板培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、琼脂2g,蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;110-121℃灭菌20-30min;

所述酵母菌摇瓶种子培养基和酵母菌种子罐培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;110-121℃灭菌20-30min。

6. 根据权利要求1所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:步骤(2)中所述混合乳酸菌种子液的制备方法如下:将植物乳杆菌,保加利亚乳杆菌,嗜酸乳杆菌,乳酸

乳杆菌,干酪乳杆菌分别接一环在乳酸菌MRS斜面培养基上划线活化,在33-38℃培养24-28h进行复壮,并形成单菌落,再各挑取单菌落,接种到乳酸菌种子培养基,35-38℃静置培养24-48h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量以判定接种时机;再各按以质量计算1-10%的接种量接种到乳酸菌种子罐培养基静置培养24-60h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量以判定接种时机。

7. 根据权利要求6所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:所述乳酸菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;115-120℃条件下高压灭菌20-30min;

所述乳酸菌种子培养基和乳酸菌种子罐培养基的制备方法如下:大豆低聚糖2.25%、葡萄糖2.00%、蛋白胨1.25%、酵母粉1.25%、番茄汁6.50%、吐温80 0.10%、磷酸氢二钾0.20%,余量的蒸馏水;pH 6.5,1L的三角瓶装液量200mL;115-120℃条件下高压灭菌20-30min。

8. 根据权利要求1所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:步骤(2)中所述混合双歧杆菌种子液的制备方法如下:取两歧双歧杆菌,动物双歧杆菌菌种,在厌氧操作台上,在双歧杆菌MRS斜面培养基上划线复壮,置于37℃厌氧培养36h后挑选强壮单菌落,接入装有10mL液体MRS培养基的充满氮气的厌氧管中,置于37℃厌氧培养24h;再按1%的接种量,接种到1L厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基中置于37℃厌氧培养24h,然后再按2%的接种量接到种子罐双歧杆菌增殖培养基中,进行37℃厌氧培养20h后即得,活菌数达 1×10^8 cfu/mL。

9. 根据权利要求8所述的水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,其特征在于:所述双歧杆菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;115-120℃条件下高压灭菌15-30min;

所述液体MRS培养基的制备方法同双歧杆菌MRS斜面培养基,不同之处在于未添加琼脂;

所述厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基以及种子罐双歧杆菌增殖培养基的制备方法如下:蛋白胨5.0g,牛肉膏5.0g,胰蛋白胨10.0g,酵母浸出粉5.0g,葡萄糖10.0g,吐温-80 1.0ml, K_2HPO_4 2.0g,乙酸钠5.0g,柠檬酸氢二铵2.0g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g,聚果糖5g和碳酸钙1g番茄汁65ml;加蒸馏水至1000ml,调pH值为6.5;115-120℃条件下高压灭菌15-30min。

10. 一种权利要求1制备的水飞蓟粕微生物饲料的应用,其特征在于添加到普通饲料中去进行应用,添加量为以质量计算5%-30%。

一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及饲料的制备领域,尤其涉及一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 目前饲料产业市场规模巨大,并且以每年约15%的速率增加,但利润却很低,绝大多数是以粮食为原料进行生产,成本难以降低。以非粮原料通过系列微生物处理生产价廉物美的生物饲料,将是今后的发展方向之一。微生物饲料是近年热门起来型环保安全饲料,由益生菌等为主要发酵菌种生产的活性饲料,菌酶丰富,小分子蛋白小肽等含量占主要成份,对动物具有防治疾病、促进生长、提高饲料利用率、保健等多方面的益生作用,可以完全或部分替代抗生素。

[0003] 水飞蓟粕是中药厂提取水飞蓟素后的残渣,大部分情况会进行丢弃从而污染了环境,还有一部分情况以低价买给牛羊养殖户,但是难以得到较好的利用。实际上水飞蓟粕还含有20%以上的蛋白,碳水化合物丰富,其中淀粉20%以上,粗纤维30%到40%,特别是总黄酮残留量有1%以上,如果将其应用到动物的饲料上去,利用价值显著;但是按目前的大部分做法直接以一定比例给动物进行添加,存在动物适口性不佳,消化吸收率低,附加值不高,饲用效果不显著的问题。

[0004] 将水飞蓟粕用于生产微生物饲料目前也有极少数的报道,如中国发明专利201210183876.5公开了一种用黑曲霉和热带假丝酵母接种后好氧发酵,再干燥成成品的方法;但是培养基灭菌,发酵成品要干燥处理都增大成本,设备要求高,并且干燥处理后菌酶及功能物质活性大打折扣,适口性不佳,加上尿素等无机氮的残留把控不好会引起单胃动物的中毒。

[0005] 若能提出一种生产成本较低,且极大的利用水飞蓟粕中营养成分,适口性较好的水飞蓟粕微生物饲料将会带来很大的市场效益。

发明内容

[0006] 发明目的:为了克服现有技术中存在的问题,本发明提出了一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法及其应用,制备原料无需灭菌处理,产品无需干燥处理,生产成本低,产品活菌数高,酶含量丰富,杂菌少,大幅度提高了畜禽饲料的利用率。

[0007] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 一期固态发酵:将复合水飞蓟粕添加2-200g/t的纤维素酶(酶活力为1万u/g), 6-200g/t的木聚糖酶(酶活力为18万u/g)、1-20g/t的甘露聚糖酶(酶活力为1万u/g)、3-300g/t的 α -半乳糖苷酶(酶活力为500u/g)、1-200g/t的酸性蛋白酶(酶活力为6万u/g)、1-200g/t的 β 葡聚糖酶(酶活力为5万u/g)、1-100g/t的植酸酶(酶活力为10万u/g)以及以质量计算0.05-0.5%的磷酸氢钙制备成复合水飞蓟粕混合物;以复合水飞蓟粕混合物为原料,

接种混合芽孢杆菌液体菌种和混合酵母菌液体菌种,两种菌种的接种量均为0.1%-10%;接种后充分搅拌,28-38℃通气发酵12-36h,得一期固态发酵半成品;其中所述复合水飞蓟粕以质量计算包括10%-50%的水飞蓟粕、10%-30%的醋渣或酒渣、32%-50%的水;

[0009] (2) 二期固态发酵:将混合乳酸菌种子液与双歧杆菌种子液按照1:(1-4)混合后,接种到一期固态发酵半成品上,接种量为0.1%-12%;充分搅拌,装入单向膜厌氧袋,常温下进行二期厌氧发酵2周以上后即可得到所需水飞蓟粕微生物饲料。

[0010] 本发明采用的主力益生菌为乳酸菌、双歧杆菌、酵母菌、枯草杆菌都在美国FDA、饲料管理协会及中国农业部公布的益生菌中,枯草杆菌类能形成芽孢,将自己保护起来,发芽快,复活率高,最能耐酸、碱、盐及抗高温高压,因而在饲料加工、保存、通过胃酸环境等过程中有较高的稳定性。酵母菌是好氧兼厌氧的特性,定植肠道后可夺取肠内有限的氧气,维持肠内厌氧环境,从而促进乳酸菌、双歧杆菌等的生长,抑制各种有害菌的繁殖。这些益生菌生产丰富的酶群、维生素、氨基酸、有机酸、寡糖等物质,提高饲料利用率和总体营养水平,促进机体免疫器官成熟,使T淋巴细胞和B淋巴细胞增多,提高机体的免疫力,同时,枯草杆菌可产生70多种包括枯草杆菌素等抗菌物质,能杀死或抑制大部分葡萄球菌、链球菌、绿脓杆菌、肠道杆菌、沙门氏菌、变形杆菌等有害菌。枯草杆菌能产生氨基氧化酶及分解硫化氢的酶类等,动物食用后,粪便恶臭大大降低。

[0011] 此外,由于枯草杆菌、酵母菌、乳酸菌、双歧杆菌等都不能有效地降解木质纤维素,本发明加入了纤维素酶,半纤维素酶,果胶酶,植酸酶、蛋白酶等酶制剂;填补了其功效空缺。

[0012] 更进一步的,步骤(1)中所述混合芽孢杆菌液体菌种的培养方法为:无菌条件下分别将4℃保存的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、纳豆杆菌各接一环至芽孢杆菌斜面培养基中,30-37℃培养16-36h复苏菌种;再在芽孢杆菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到芽孢杆菌摇瓶种子培养基中,装液量100-300mL/L三角瓶,150-240r/min,28-38℃,培养16-24h,再以以质量计1-10%的接种量混合接种到200L的芽孢杆菌种子罐培养基中进行扩大培养,150-240r/min,通气量为20-50L/min,培养16-24h后制得复合芽孢杆菌液体菌种。

[0013] 更进一步的,所述芽孢杆菌斜面培养基和平板培养基的制备方法如下:蛋白胨10g,牛肉膏粉5g,氯化钠5g,琼脂15g,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL,最终pH为7.0±0.2;110-121℃灭菌20-30min;

[0014] 所述芽孢杆菌摇瓶种子培养基和芽孢杆菌种子罐培养基的制备方法如下:牛肉膏5.0g/L,蛋白胨20.0g/L,葡萄糖5.0g/L,FeCl₂·6H₂O 0.07g/L,MnCl₂·7H₂O 0.01g/L,MgSO₄·7H₂O 0.15g/L,pH 6.5-7.0,110-121℃灭菌20-30min。

[0015] 更为优选的,步骤(1)中所述混合酵母菌液体菌种的培养方法为:无菌条件下分别将4℃保存的酵母菌菌种啤酒酵母,热带假丝酵母分别接一环至酵母菌斜面培养基中,28-38℃培养24-48h复苏菌种;再挑单菌落各在酵母菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到酵母菌摇瓶种子培养基,装液量为每L三角瓶装液100-300mL,150-240r/min,28-38℃,培养24-48h,再以以质量计算1-10%的接种量混合接种到200L的酵母菌种子罐培养基中进行扩大培养,150-240r/min,通气量为20-50L/min,培养24-48h后制得复合酵母菌液体菌种。

[0016] 更进一步的,所述酵母菌斜面培养基和酵母菌平板培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、琼脂2g,蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;110-121℃灭菌20-30min;

[0017] 所述酵母菌摇瓶种子培养基和酵母菌种子罐培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;110-121℃灭菌20-30min。

[0018] 更为优选的,步骤(2)中所述混合乳酸菌种子液的制备方法如下:将植物乳杆菌,保加利亚乳杆菌,嗜酸乳杆菌,乳酸乳杆菌,干酪乳杆菌分别接一环在乳酸菌MRS斜面培养基上划线活化,在33-38℃培养24-28h进行复壮,并形成单菌落,再各挑取单菌落,接种到乳酸菌种子培养基,35-38℃静置培养24-48h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量以判定接种时机;再各按以质量计算1-10%的接种量接种到乳酸菌种子罐培养基静置培养24-60h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量以判定接种时机。

[0019] 更进一步的,所述乳酸菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L,K₂HPO₄ 2g/L,MgSO₄·7H₂O 0.58g/L,MnSO₄·4H₂O 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;115-120℃条件下高压灭菌20-30min;

[0020] 所述乳酸菌种子培养基和乳酸菌种子罐培养基的制备方法如下:大豆低聚糖2.25%、葡萄糖2.00%、蛋白胨1.25%、酵母粉1.25%、番茄汁6.50%、吐温80 0.10%、磷酸氢二钾0.20%,余量的蒸馏水;pH 6.5,1L的三角瓶装液量200mL;115-120℃条件下高压灭菌20-30min。

[0021] 更为优选的,步骤(2)中所述混合双歧杆菌种子液的制备方法如下:取两歧双歧杆菌,动物双歧杆菌菌种,在厌氧操作台上,在双歧杆菌MRS斜面培养基上划线复壮,置于37℃厌氧培养36h后挑选强壮单菌落,接入装有10mL液体MRS培养基的充满氮气的厌氧管中,置于37℃厌氧培养24h;再按1%的接种量,接种到1L厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基中置于37℃厌氧培养24h,然后再按2%的接种量接到种子罐双歧杆菌增殖培养基中,进行37℃厌氧培养20h后即得,活菌数达1×10⁸cfu/mL。

[0022] 更进一步的,所述双歧杆菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L,K₂HPO₄ 2g/L,MgSO₄·7H₂O 0.58g/L,MnSO₄·4H₂O 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;115-120℃条件下高压灭菌15-30min;

[0023] 所述液体MRS培养基的制备方法同双歧杆菌MRS斜面培养基,不同之处在于未添加琼脂;

[0024] 所述厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基以及种子罐双歧杆菌增殖培养基的制备方法如下:蛋白胨5.0g,牛肉膏5.0g,胰蛋白胨10.0g,酵母浸出粉5.0g,葡萄糖10.0g,吐温-80 1.0ml,K₂HPO₄ 2.0g,乙酸钠5.0g,柠檬酸氢二铵2.0g,ZnSO₄·7H₂O 0.25g,MgSO₄·7H₂O 0.1g,聚果糖5g和碳酸钙1g番茄汁65ml;加蒸馏水至1000ml,调pH值为6.5;115-120℃条件下高压灭菌15-30min。

[0025] 本发明还公开了上述方法制备的水飞蓟粕微生物饲料的应用,具体为添加到普通饲料中去进行应用,添加量为以质量计算5%-30%。

[0026] 有益效果:本发明提供的一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法及应用,与现有技术

术相比,具有以下优点:

[0027] (1)对各种菌种进行分布发酵,需氧菌和厌氧菌生长都能有效地生长,进一步增加了活菌含量;

[0028] (2)制备原料无需进行灭菌,制备产品无需进行干燥处理,降低生产成本;

[0029] (3)微生物饲料成品中含有丰富的活菌、酶群、维生素、脂类、有机酸、氨基酸、各种寡糖及辅酶因子、小肽等功能物质,且杂菌少,饲用效果明显;提高饲料利用率;

[0030] (4)有效提高饲喂对象免疫力和抵抗力,代替抗生素的使用,进一步改善动物产品品质,消除栏舍恶臭,生态效益明显。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细说明:

[0032] 实施例1:

[0033] 一种水飞蓟粕微生物饲料的制备方法,包括如下步骤:

[0034] (1)一期固态发酵:

[0035] 1-A)复合水飞蓟粕混合物的制备:

[0036] 按40%的水飞蓟粕、25%的醋渣的比例准备复合水飞蓟粕,控制含水量为35%;向复合水飞蓟粕中添加20g/t的纤维素酶(酶活力为1万u/g),20g/t的木聚糖酶(酶活力为18万u/g)、5g/t的甘露聚糖酶(酶活力为1万u/g)、30g/t的 α -半乳糖苷酶(酶活力为500u/g)、20g/t的酸性蛋白酶(酶活力为6万u/g)、20g/t的 β 葡聚糖酶(酶活力为5万u/g)、20g/t的植酸酶(酶活力为10万u/g)以及以质量计算0.2%的磷酸氢钙制备成复合水飞蓟粕混合物;

[0037] 1-B)混合芽孢杆菌液体菌种的培养:

[0038] 无菌条件下分别将4℃保存的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、纳豆杆菌各接一环至芽孢杆菌斜面培养基中,37℃培养24h复苏菌种;再在芽孢杆菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到芽孢杆菌摇瓶种子培养基中,装液量200mL/L三角瓶,220r/min,37℃,培养18h,再以以质量计2%的接种量混合接种到200L的芽孢杆菌种子罐培养基中进行扩大培养,220r/min,通气量为30L/min,培养16h后制得复合芽孢杆菌液体菌种;

[0039] 其中,所述芽孢杆菌斜面培养基和平板培养基的制备方法如下:蛋白胨10g,牛肉膏粉5g,氯化钠5g,琼脂15g,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL,最终pH为7.0;121℃灭菌20min;

[0040] 所述芽孢杆菌摇瓶种子培养基和芽孢杆菌种子罐培养基的制备方法如下:牛肉膏5.0g/L,蛋白胨20.0g/L,葡萄糖5.0g/L, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.07g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g/L,pH 7.0,121℃灭菌20min。

[0041] 1-C)混合酵母菌液体菌种的培养:

[0042] 无菌条件下分别将4℃保存的酵母菌菌种啤酒酵母,热带假丝酵母分别接一环至酵母菌斜面培养基中,32℃培养36h复苏菌种;再挑单菌落各在酵母菌平板培养基上划单菌落,挑取健壮种子,分别接种到酵母菌摇瓶种子培养基,装液量为每L三角瓶装液200mL,220r/min,32℃,培养24h,再以以质量计算2%的接种量混合接种到200L的酵母菌种子罐培养基种进行扩大培养,220r/min,通气量为30L/min,培养24h后制得复合酵母菌液体菌种。

[0043] 其中所述酵母菌斜面培养基和酵母菌平板培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、琼脂2g,蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;121℃灭菌20min;

[0044] 所述酵母菌摇瓶种子培养基和酵母菌种子罐培养基的制备方法如下:葡萄糖2g、酵母浸出物1g、蛋白胨2g、蒸馏水补充至100mL;pH值为6.0;110-121℃灭菌20min。

[0045] 1-D) 一期固态发酵半成品的制备:

[0046] 以步骤1-A) 制备的复合水飞蓟粕混合物为原料,接种步骤1-B) 制备的混合芽孢杆菌液体菌种和步骤1-C) 制备的混合酵母菌液体菌种,两种菌种的接种量均为1%;接种后充分搅拌,37℃通气发酵24h,得一期固态发酵半成品。

[0047] (2) 二期固态发酵:

[0048] 2-A) 混合乳酸菌种子液的制备:

[0049] 将植物乳杆菌,保加利亚乳杆菌,嗜酸乳杆菌,乳酸乳杆菌,干酪乳杆菌分别接一环在乳酸菌MRS斜面培养基上划线活化,在37℃培养36h进行复壮,并形成单菌落,再各挑取单菌落,接种到乳酸菌种子培养基37℃静置培养24h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量,菌量较浓时即可进行接种;再各按以质量计算1-10%的接种量接种到乳酸菌种子罐培养基静置培养24-60h,通入氮气使溶氧维持为0,定时取样,测定生物量,菌量较浓时即可进行接种。

[0050] 其中所述乳酸菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;120℃条件下高压灭菌20min;

[0051] 所述乳酸菌种子培养基和乳酸菌种子罐培养基的制备方法如下:大豆低聚糖2.25%、葡萄糖2.00%、蛋白胨1.25%、酵母粉1.25%、番茄汁6.50%、吐温80 0.10%、磷酸氢二钾0.20%,余量的蒸馏水;pH 6.5,1L的三角瓶装液量200mL;115-120℃条件下高压灭菌20-30min。

[0052] 2-B) 混合双歧杆菌种子液的制备:

[0053] 取两歧双歧杆菌,动物双歧杆菌菌种,在厌氧操作台上,在双歧杆菌MRS斜面培养基上划线复壮,置于37℃厌氧培养36h后挑选强壮单菌落,接入装有10mL液体MRS培养基的充满氮气的厌氧管中,置于37℃厌氧培养24h;再按1%的接种量,接种到1L厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基中置于37℃厌氧培养24h,然后再按2%的接种量接到种子罐双歧杆菌增殖培养基中,进行37℃厌氧培养20h后即得,活菌数达 1×10^8 cfu/mL。

[0054] 其中所述双歧杆菌MRS斜面培养基的制备方法如下:蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,牛肉膏5g/L,葡萄糖20g/L,柠檬酸二铵2g/L,吐温80 1.0ml/L,乙酸钠25g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g/L,琼脂20g/L,pH 7.0;120℃条件下高压灭菌15min;

[0055] 所述液体MRS培养基的制备方法同双歧杆菌MRS斜面培养基,不同之处在于未添加琼脂;

[0056] 所述厌氧瓶双歧杆菌增殖培养基以及种子罐双歧杆菌增殖培养基的制备方法如下:蛋白胨5.0g,牛肉膏5.0g,胰蛋白胨10.0g,酵母浸出粉5.0g,葡萄糖10.0g,吐温-80 1.0ml, K_2HPO_4 2.0g,乙酸钠5.0g,柠檬酸氢二铵2.0g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g,聚果糖5g和碳酸钙1g番茄汁65ml;加蒸馏水至1000ml,调pH值为6.5;120℃条件下高压灭菌15min。

[0057] 2-C) 二期固态发酵培养饲料成品的制备:

[0058] 将步骤2-A) 制备的混合乳酸菌种子液与步骤2-B) 制备的双歧杆菌种子液按照1:1混合后,接种到一期固态发酵半成品上,接种量为1%;充分搅拌,装入单向膜厌氧袋,常温下进行二期厌氧发酵2周以上,含水量为36%,即可得到所需水飞蓟粕微生物饲料,其产品保质期为1-2年,保存一个月活菌数目达到高峰,可达1亿cfu/g固体以上。

[0059] 实施例2:

[0060] 其他实施方式与实施例1相同,不同之处在于步骤1-D) 中混合芽孢杆菌液体菌种的接种量为10%,步骤1-A) 中酸性蛋白酶(酶活力为6万u/g)的添加量为200g/t。

[0061] 实施例3:

[0062] 其他实施方式与实施例1相同,不同之处在于步骤1-A) 中纤维素酶(酶活力为1万u/g)的添加量为200g/t;木聚糖酶(酶活力为18万u/g)的添加量为200g/t甘露聚糖酶(酶活力为1万u/g)的添加量为20g/t; α -半乳糖苷酶(酶活力为500u/g)的添加量为300g/t; β 葡聚糖酶(酶活力为5万u/g)的添加量为200g/t。

[0063] 成品分析:

[0064] 对于实施例1-3经过二期厌氧发酵一个月后的微生物饲料成品进行样品检测后,具体如表1所示:

[0065] 表1实施例1-3微生物饲料成品测试

测定项目	测定方法	实施例 1	实施例 2	实施例 3
粗蛋白质 (%)	GB/T 6432-1994	20.9%	21.3%	21.1%
小肽比例	15%TCA 法	21.8%	30.2%	24.8%
活菌总数	平板法	1.2 亿 CFU/g	1.8 亿 CFU/g	1.4 亿 CFU/g
pH	pH 测定仪	4.10	4.0	4.05
粗灰分 (%)	GB/T 6438-2007	7.65	7.75	7.71
[0066] 黄曲霉素 B1	HPLC	未检出 ($<1\mu\text{g}/\text{Kg}$)	未检出 ($<1\mu\text{g}/\text{Kg}$)	未检出 ($<1\mu\text{g}/\text{Kg}$)
脱氧雪腐化镰 刀菌烯醇 (呕 吐毒素)	HPLC	未检出 ($<0.5\text{mg}/\text{Kg}$)	未检出 ($<0.5\text{mg}/\text{Kg}$)	未检出 ($<0.5\text{mg}/\text{Kg}$)
玉米赤霉烯酮	HPLC	53 (指 标要求 $<500\mu\text{g}/\text{Kg}$)	50 (指标要 求 $<500\mu\text{g}/\text{Kg}$)	60 (指标要 求 $<500\mu\text{g}/\text{Kg}$)
粗纤维	GB/T 6434-2006	18.1%	18.3%	14.2%
沙门氏菌 (cfu/25g)	GB/T 13091-200	未检出	未检出	未检出
[0067]	2			

[0068] 结果分析:

[0069] 从表1中可以看出,本发明实施例1-3制备的一种水飞蓟粕微生物饲料酸度,按pH计,已降到4.1,意味品质开始稳定,保质期可达1年以上。粗蛋白达20%以上,已超过一般哺乳母猪料的蛋白量,小肽含量丰富,大大提高吸收率,益生菌活菌总数,在混合其它饲料稀释后,还是达到菌量浓度要求,能很好的达到益生效果,霉菌毒素含量在中国一般饲料都有测到,不少严重超标,全国麸皮呕吐毒素几乎都是超标,但本产品含量极低,达到了绿色安全的标准。

[0070] 应用实施例4:

[0071] 试验点为浙江嘉兴南湖余新镇大不同猪场,取40只保育猪(长白猪),20公斤左右,随机组合成两组,每组20只,其中试验组中添加了15%的本发明实施例1制备的水飞蓟粕微

生物饲料,对照组并未添加,而是用等量的麸皮代替,其余日粮组成相同,具体试验日粮配方如表2,饲养90天,试验结果如表3。

[0072] 表2试验组与对照组日粮配方(%)

[0073]

日粮组成	试验组	对照组
玉米	62	62
豆粕	19	19
预混料	4	4
麸皮	0	15
水飞蓟粕微生物饲料	15	0
合计	100	100

[0074] 表3饲养试验结果

项目 \ 组别	试验组	对照组
实验猪数量(头)	20	20
平均始重(kg/头)	20.1±1.61	20.2±1.33
平均末重(kg/头)	98±1.8	86±1.4
全期净增重(kg/头)	77.9	65.8
平均日增重(kg/头·日)	0.865	0.73
平均耗料量(kg/头)	180.2	176.2
日采食量(kg/头·日)	2.0	1.96
料肉比	2.31:1	2.67:1

[0077] 从表3中可以看出,本发明制备的水飞蓟粕微生物饲料成本价为2000元/吨,售价为2500元每吨,所以以15%的本发明微生物饲料代替15%的麸皮,麸皮按1500元每吨算,从日粮饲料成本上试验组饲料成本多28.8元。但是使用本生物饲料的料肉比从2.67:1下降到2.31:1,总体上讲,全期毛重相对于对照组增加12.1kg,猪价以18元/kg计算增加217.8元,因此每头猪直接增加收入约189元,不包括用药减少,生病减少,肉质好猪价略高等增收因素,总体上讲,使用本生物饲料,经济效果非常明显。

[0078] 应当指出,以上具体实施方式仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定的范围。