



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105994990 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610374941.0

(22)申请日 2016.05.31

(71)申请人 灵宝市帅华牧业有限责任公司

地址 472500 河南省三门峡市灵宝市农业  
高新示范园

(72)发明人 孔向军 邹吉祥 苏印泉 孔艳华  
王淑霞 王正泽 马权辉 陈合强

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通  
合伙) 41104

代理人 时立新 张丽

(51)Int. Cl.

A23K 10/30(2016.01)

A23K 10/37(2016.01)

A23K 20/24(2016.01)

A23K 10/12(2016.01)

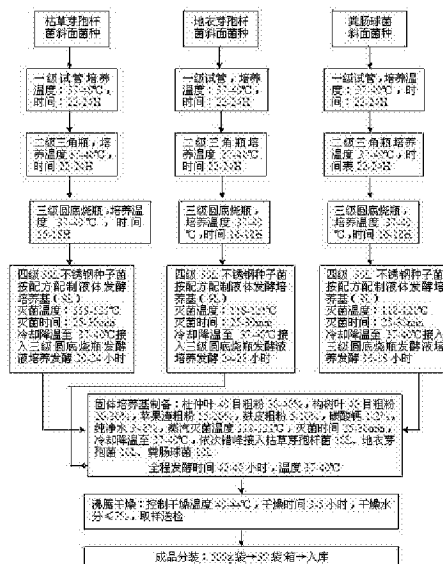
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制  
备方法

(57)摘要

一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制  
备方法,其是以枯草芽孢杆菌、地衣芽孢菌和粪  
肠球菌三种益生菌分别配制成三种液体发酵液,  
并根据益生菌不同的生化特征,采取错峰接种发  
酵的程序,依次接种于以杜仲叶、构树叶、苹果渣  
和麸皮四种天然可再生植物资源为原料的固体  
培养基中,一次性完成固体发酵的复合饲料添加  
剂。同时超前将人用药品G、M、P的生产和质量规  
范贯穿于产品生产的全过程,防止生产环境和设  
备对产品造成污染,使三种益生菌和四种天然可  
再生植物资源的营养成分和生物功效,得到充分  
的释放和互利互补。



1. 一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)制备固体培养基,固体培养基由下述质量百分含量的物质组成:杜仲叶40目粗粉30-40%,构树叶40目粗粉20-30%,苹果渣40目粗粉15-20%,麸皮5-10%,碳酸钙1-2%,纯净水3-8%;所得固体培养基 pH为7.0-7.2,118℃-121℃蒸汽灭菌25-30min,冷却至37℃-40℃;

(2)在固体培养基上接种四级枯草芽孢杆菌的发酵液,在37-40℃发酵8-10h后,接种四级地衣芽孢杆菌的发酵液,在37-40℃发酵8-10h后,接种四级粪肠球菌的发酵液,在37-40℃发酵18-24h,全程固体发酵时间控制在42-48h,三种菌发酵液的接种总量均为固体培养基体积的10%-15%且三种菌发酵液的接种量相同;

(3)将发酵好的物料转入沸腾干燥间,控制沸腾干燥温度40℃-44℃,待物料水分 $\leq$ 7%时,即可取样送检,检验合格后按规定分装和包装。

2. 根据权利要求1所述的杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,其特征在于,四级枯草芽孢杆菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨1-3%,牛肉膏0.3-0.5%,氯化钠0.3-0.5%,硫酸铵0.03-0.05%,以上原料均为质量百分比,每10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,培养液调pH为6.8-7.0,按照体积百分比5-10%进行接种,37℃-40℃培养,培养时间为一、二级培养22-24h,三级培养16-18h,四级培养20-24h;四级地衣芽孢杆菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨1-3%,牛肉膏0.1-0.5%,氯化钠0.1-0.5%,以上原料均为质量百分比,每10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,调pH7.0-7.2,按照体积百分比5-10%进行接种,37℃-40℃培养,培养时间为一、二级培养22-24h,三级培养16-18h,四级培养24-28h;四级粪肠球菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨2-4%,牛肉膏0.1-0.5%,氯化钠0.1-0.5%,一、二级培养用乳糖2-5%,三、四级培养用葡萄糖2-4%,三、四级培养用碳酸钙0.5-1.5%,以上原料均为质量百分比,每10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,调pH7.0-7.2,按照体积百分比5-10%进行接种,37℃-40℃培养,培养时间为一、二级培养22-24h,三、四级培养16-18h;其中,所述杜仲叶提取液的制备方法为:将合格的杜仲新鲜干叶称取500克,先加水500ml浸润1小时,再加2500ml水进行第一次浸泡提取1小时,浸润和浸泡温度均为60-80℃,分离浸泡提取液,对分离出来的杜仲叶再加2000ml水进行第二次浸泡提取,浸泡温度60-80℃,浸泡时间1小时,合并两次浸泡提取液即得。

3. 根据权利要求2所述的杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,其特征在于,四级枯草芽孢杆菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\varnothing$ 15×150mm试管、250ml三角瓶、3000ml圆底烧瓶中,培养基的装入量分别9ml、175ml、1000ml,控制灭菌温度118~121℃,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种使用;

2)液体菌种制备:取生产用枯草芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37℃-40℃恒温培养22-24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37℃-40℃恒温培养22-24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37℃-40℃恒温培养16-18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40℃,间隔1小时搅拌5-10分钟,培养发酵时间20-24小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

4. 根据权利要求2所述的杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,其特征在于,四

级地衣芽孢杆菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\Phi 15 \times 150$ mm试管、250ml三角瓶、3000ml圆底烧瓶中,培养基的装入量分别9ml、175ml、1000ml,控制灭菌温度118~121 $^{\circ}\text{C}$ ,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种使用;

2)液体菌种制备:取生产用地衣芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养22-24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养22-24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养16-18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40 $^{\circ}\text{C}$ ,培养发酵时间24~28小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

5. 根据权利要求2所述的杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,其特征在于,四级粪肠球菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\Phi 15 \times 150$ mm试管、250ml三角瓶、3000ml圆底烧瓶中,培养基的装入量分别9ml、175ml、1000ml,控制灭菌温度118~121 $^{\circ}\text{C}$ ,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种;

2)液体菌种制备:取生产用地衣芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养22-24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养22-24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养16-18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40 $^{\circ}\text{C}$ ,间隔1小时搅拌5-10分钟,培养发酵时间16~18小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

## 一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于饲料领域,特别是涉及一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法。

### 背景技术

[0002] 在现代化养殖中,饲料添加剂的使用十分广泛。现有的饲料添加剂绝大部分含有化学合成药物、抗生素、激素等,这类添加剂虽然具有预防疾病、促进生长等作用,但长期使用副作用大,如产生抗药性、降低动物疾病防治效果,而且会在肉、蛋、奶及环境中产生药物残留,影响人体健康。由于中草药副作用小、不易产生有害残留,中草药饲料添加剂的研究开发已成热点。一般来说,现有的中草药饲料添加剂中中草药种类较多,配制相对繁琐,而且由于中草药未经处理,有效成份不易被吸收。

[0003] 杜仲为传统中草药,其药用和保健价值已被广泛认识,在饲料中添加杜仲已有记载,但由于现有技术中的杜仲叶未经提纯和灭菌处理,畜禽难以充分吸收杜仲叶中地有效成份,其对畜禽的抗病、治疗作用难以充分体现。

[0004] 饲料添加剂抗生素的危害日益显现,受到社会的广泛关注,寻求一种替代品和替代技术,既能保证畜牧业的生产效益不受影响,又能达到食品安全的标准是极需研究的课题。这方面当前研究的聚焦点,一是被广为利用的微生态制剂及其代谢产物。二是从我国丰富的中药材宝库中挖掘潜力。本发明是在以上研究多项发明专利的基础上,结合实际应用方面存在的利弊,为使生产成本更低,实际应用效果更佳,可操作性更强,加以改进后产生的一种新型杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法。

[0006] 基于上述目的,本发明采取如下技术方案:

一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,包括如下步骤:

(1)制备固体培养基,固体培养基由下述质量百分含量的物质组成:杜仲叶40目粗粉30-40%,构树叶40目粗粉20-30%,苹果渣40目粗粉15-20%,麸皮5-10%,碳酸钙1-2%,纯净水3-8%;所得固体培养基 pH为7.0-7.2,118℃-121℃蒸汽灭菌25-30min,冷却至37℃-40℃;

(2)在固体培养基上接种四级枯草芽孢杆菌的发酵液,在37-40℃发酵8-10h后,接种四级地衣芽孢杆菌的发酵液,在37-40℃发酵8-10h后,接种四级粪肠球菌的发酵液,在37-40℃发酵18-24h,全程固体发酵时间控制在42-48h,三种菌发酵液的接种总量均为固体培养基体积的10%-15%且三种菌发酵液的接种量相同;

(3)将发酵好的物料转入沸腾干燥间,控制沸腾干燥温度40℃-44℃,待物料水分 $\leq$ 7%时,即可取样送检,检验合格后按规定分装和包装。

[0007] 其中,四级枯草芽孢杆菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨1-3%,牛肉膏0.3-0.5%,氯化钠0.3-0.5%,硫酸铵0.03-0.05%,以上原料均为质量百分比,每

10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,培养液调pH为6.8~7.0,按照体积百分比5~10%进行接种,37℃~40℃培养,培养时间为一、二级培养22~24h,三级培养16~18h,四级培养20~24h;四级地衣芽孢杆菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨1~3%,牛肉膏0.1~0.5%,氯化钠0.1~0.5%,以上原料均为质量百分比,每10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,调pH7.0~7.2,按照体积百分比5~10%进行接种,37℃~40℃培养,培养时间为一、二级培养22~24h,三级培养16~18h,四级培养24~28h;四级粪肠球菌的发酵液液体培养基配方和发酵工艺参数为:蛋白胨2~4%,牛肉膏0.1~0.5%,氯化钠0.1~0.5%,一、二级培养用乳糖2~5%,三、四级培养用葡萄糖2~4%,三、四级培养用碳酸钙0.5~1.5%,以上原料均为质量百分比,每10L培养液需添加杜仲叶提取液115~125mL,调pH7.0~7.2,按照体积百分比5~10%进行接种,37℃~40℃培养,培养时间为一、二级培养22~24h,三、四级培养16~18h;其中,所述杜仲叶提取液的制备方法为:将合格的杜仲新鲜干叶称取500克,先加水500ml浸润1小时,再加2500ml水进行第一次浸泡提取1小时,浸润和浸泡温度均为60~80℃,分离浸泡提取液,对分离出来的杜仲叶再加2000ml水进行第二次浸泡提取,浸泡温度60~80℃,浸泡时间1小时,合并两次浸泡提取液即得。

[0008] 进一步地,四级枯草芽孢杆菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\varnothing$ 15×150mm试管(一级培养用)、250ml三角瓶(二级培养用)、3000ml圆底烧瓶(三级培养用)中,培养基的装入量分别9ml、175ml、1000ml,控制灭菌温度118~121℃,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种使用;

2)液体菌种制备:取生产用枯草芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37℃~40℃恒温培养22~24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37℃~40℃恒温培养22~24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37℃~40℃恒温培养16~18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40℃,间隔1小时搅拌5~10分钟,培养发酵时间20~24小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

[0009] 四级地衣芽孢杆菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\varnothing$ 15×150mm试管(一级培养用)、250ml三角瓶(二级培养用)、3000ml圆底烧瓶(三级培养用)中,培养基的装入量分别9ml、175ml、1000ml,控制灭菌温度118~121℃,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种使用;

2)液体菌种制备:取生产用地衣芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37℃~40℃恒温培养22~24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37℃~40℃恒温培养22~24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37℃~40℃恒温培养16~18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40℃,培养发酵时间24~28小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

[0010] 四级粪肠球菌的发酵液的制备方法如下:1)培养基的制备:按照上述配方称取相应原料,混合均匀后加水进行定容,并分别置于 $\varnothing$ 15×150mm试管(一级培养用)、250ml三角瓶(二级培养用)、3000ml圆底烧瓶(三级培养用)中,培养基的装入量分别9ml、175ml、

1000ml,控制灭菌温度118~121℃,灭菌时间25~30min,灭菌后分别冷却至室温置于冰箱冷藏备用或直接供接、转种;

2)液体菌种制备:取生产用地衣芽孢杆菌斜面菌种1支,按无菌操作要求接种一级试管,经37℃-40℃恒温培养22-24小时,一级试管菌种成熟后转种二级三角瓶,同样经37℃-40℃恒温培养22-24小时,二级三角瓶菌种成熟后转种三级圆底烧瓶、三级圆底烧瓶菌种经37℃-40℃恒温培养16-18小时成熟后采用火焰接种法转种四级30L不锈钢种子罐;在9L液体培养基中保持培养发酵温度37~40℃,间隔1小时搅拌5-10分钟,培养发酵时间16~18小时,四级30L不锈钢种子罐菌种成熟后接种于前述灭菌后的固体培养基中。

[0011] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号为CGMCC No.1.831,枯草芽孢菌是好氧性微生物,是应用最广泛的芽孢杆菌,代谢产物种类多,有明显的产酶和产细菌素功能,对湿热、胃酸稳定,能在肠道环境中有效增殖与代谢。

[0012] 粪肠球菌(编号140623,购自于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,拉丁学名为:*E. faecalis*)属兼性厌氧菌,革兰氏阳性,肠道重要的有益菌,可产生乳酸、乙酸、异丁酸和细菌素抑制病原菌。

[0013] 地衣芽孢杆菌来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(*Bacillus licheniformis*,CGMCCNo.8147),性质稳定,具有耐热耐酸,及对常用抗生素有抗性等特点,适用pH范围广,兼性厌氧菌,适应于动物肠道的无氧环境,增殖速度、增殖倍率大。主要的代谢产物是淀粉酶、蛋白酶和部分抗病物质。

[0014] 本发明针对枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、地衣芽孢杆菌三种菌的生化特征,选择杜仲叶、构树叶、苹果渣、麸皮四种可再生植物营养资源;杜仲叶2005年被列入中国药典,属于药食同源范围,我国栽植面积广达40万亩,占世界总量的98%以上。杜仲叶具有强筋骨、补肝肾,为中药之上品。主要成份碳水化合物含量高达50.2%,蛋白质14.5%,还含有硒、锗等15种微量元素和15种游离氨基酸,且人体和动物必须的氨基酸齐全。

[0015] 构树叶(又名构桃树、构乳树等)具有速生、适应性强、分布广、易繁殖、热量高、萌发期短的特点;功能:补肾利尿,强筋骨,蛋白质含量高达20-30%,氨基酸、维生素、碳水化合物及微量元素等益生菌必需的营养都十分丰富。

[0016] 苹果渣:我国年产苹果近2000万吨,苹果加工中每年生产苹果渣近100多万吨,主要成份为可溶性碳水化合物、果胶,除脂肪酸以外的有机酸和半纤维素,用于发酵益生菌,可解决我国蛋白资源的缺乏。同时补充部分麸皮中含有较高的碳水化合物微量元素和粗纤维,在微生物发酵过程中提供能量。

[0017] 鉴于单一益生菌菌种制备的微生态制剂,实际应用中存在的局限性,合理的益生菌组合有利于益生菌的协同作用可以突显优势种群学说以及生物拮抗和增强免疫作用更显著,有益代谢产物更丰富,应用于畜禽的养殖,禽蛋肉类的品质更优良。复合后的四种天然可再生植物和营养成份、生物功效得到充分的释放,产品中丰富的活性菌体和代谢产物极大地增强了产品在畜禽养殖实际应用上的效果。

[0018] 本发明的主要目的在于提供一种无毒、无残留、无耐药性、多功能纯天然、营养丰富的复合饲料添加剂;本发明的另一个目的在于提供一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法。

[0019] 本发明的中饲料添加剂其每克成品中含活性枯草芽孢杆菌至少2个亿,每克含地衣芽孢杆菌至少1个亿,每克含粪肠球菌至少1个亿,含甘露聚糖肽 $\geq 200\text{mg/kg}$ ,含绿原酸 $\geq 0.4\%$ ,京尼平苷酸 $\geq 0.4\%$ ,总黄酮 $\geq 0.4\%$ ,含总糖 $\geq 12\%$ ,含蛋白质 $\geq 12\%$ 。

[0020] 较优地,前述的一种复合饲料添加剂,其中所述的杜仲叶、构树叶、苹果渣、麸皮四种原料的预处理为每年9—10月份采摘的新鲜杜仲叶和构树叶,必须及时经过高温瞬间或太阳暴晒杀青灭毒,再跟苹果渣、麸皮分别经过干燥除杂、粉碎过40目筛后包装备用。

[0021] 本发明具有下列优点:

(1)本发明所选择的三种益生菌,克服了单一菌种在应用中的局限性,三种菌都具有较强的耐酸碱能力,芽孢杆菌还具有耐热耐湿能力,均能在动物体内低pH值及胆汁内生存,从而顺利进入胃肠道。三种益生菌优势互补,切实起到维护肠道菌群平衡,有益微生物优势种群学说更为突出,同时结合产品中的绿原酸、总黄酮进一步强化了杀死和抑制有害菌的作用,有效地防治动物肠道疾病,提高富余养殖的成活率。

[0022] (2)本发明由于选择了复合益生菌菌种和复合天然可再生植物资源,作为固体发酵的底物质,生化反应过程中,产生的代谢产物更加丰富。其中甘露聚糖肽和各种酶、活性小肽能充分激活动物体内吞噬细胞,干扰病毒合成,抑制病毒在动物体内正常细胞内的复制,促进体液和细胞免疫,增强动物的免疫和非特异性免疫功能,具有很强的抗病毒能力。同时,对病原微生物不易产生抗药性,没有药残和抗生素残留,是一种可以替代抗生素和化学药物类的复合饲料添加剂。

[0023] (3)本发明选择的杜仲叶、构树叶、苹果渣和麸皮四种天然可再生植物资源,丰富多彩的营养成分,加之采用三种益生菌分别经过液体制种,依次进行错峰接种发酵的方法,一次性完成固体发酵的全过程,既能均匀地促进三种益生菌的生长繁殖,使产品中活菌体和代谢产物成倍增加,又能使营养成分自身得到充分降解,更有利于动物的消化吸收,促进动物生长。产品中独有的京尼苷酸成份、临床证明具有独特的活化动物合成胶原蛋白的能力,降低动物饱和脂肪,降代胆固醇的能力,使畜禽肉蛋口感更加鲜美,更具野生风味,可以预言,随着人们对食品安全、生态安全和环境保护关注,随着人们对无公害、保健型肉、蛋、奶产品要求量的日益增加,本发明将会在动物生态养殖中起到越来越重要的作用。

## 附图说明

[0024] 图1是本发明的工艺流程图。

## 具体实施方式

[0025] 以下结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步详细说明,但本发明的保护范围并不局限于此。

[0026] 下述实施例中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号为CGMCC No.1.831。

[0027] 粪肠球菌编号140623,购自于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,拉丁学名为:*E. faecalis*。

[0028] 地衣芽孢杆菌来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(*Bacillus licheniformis*,CGMCCNo.8147)。

**[0029] 实施例1**

一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,过程如下:

杜仲叶提取液的制备:将合格的杜仲新鲜干叶称取500克,先加水500ml浸润1小时,再加2500ml水进行第一次浸泡提取1小时,浸润和浸泡温度均为60℃,分离浸泡提取液,对分离出来的杜仲叶再加2000ml水进行第二次浸泡提取,浸泡温度60℃,浸泡时间1小时,合并两次浸泡提取液即得。

**[0030] 10L 四级枯草芽孢杆菌的发酵液的制备:**

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨90g,牛肉膏22.5g,氯化钠15g,硫酸铵1.5g,杜仲叶提取液35ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠和硫酸铵置于1000ml的纯净水中,加入杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH6.8后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml),250ml三角瓶中(每瓶175ml)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌25min后,冷却备用。

**[0031] 2)10L四级发酵液制备:**

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接枯草芽孢杆菌于一级试管中39℃培养22小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中37℃培养24小时,然后取发酵好的二级发酵液按5-8v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中38℃培养18小时。

②称取蛋白胨270g,牛肉膏67.5g,氯化钠45g,硫酸铵4.5g,杜仲叶提取液115ml。先将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠和硫酸铵置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH为6.8后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌25min后迅速冷却到40℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌5分钟,40℃培养20小时即可。

**[0033] 10L 四级地衣芽孢杆菌的发酵液的制备:**

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨90g,牛肉膏15g,氯化钠15g,杜仲叶提取液35ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于1000ml的纯净水中,加入35ml杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH6.8后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml),250ml三角瓶中(每瓶175ml)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌25min后,冷却备用。

**[0034] 2)10L四级发酵液制备:**

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接地衣芽孢杆菌于一级试管中39℃培养22小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中40℃培养22小时,然后取发酵好的二级发酵液按8v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中40℃培养16小时。

②称取蛋白胨270g,牛肉膏45g,氯化钠45g,量取杜仲叶提取液115ml;先将称量好



的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液115ml,加热溶解,用20wt% NaOH或/和2N HCl调节pH为7.0后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌25min后迅速冷却到40℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌5分钟,40℃培养24小时即可。

[0036] 10L 四级粪肠球菌的发酵液的制备:

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨80g,牛肉膏15g,氯化钠15g,三级培养用碳酸钙10g,1-2级培养用乳糖8g,3级培养用葡萄糖40g,杜仲叶提取液35ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于1000ml的纯净水中,加入35ml杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH6.5后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml,预先加入0.4g乳糖),250ml三角瓶中(每瓶175ml,预先加入有7.6g乳糖)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml,圆底烧瓶预先加入10gCaCO<sub>3</sub>、40g葡萄糖),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌25min后,冷却备用。

[0037] 2)10L四级发酵液制备:

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接粪肠球菌于一级试管中39℃培养22小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中40℃培养22小时,然后取发酵好的二级发酵液按8v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中40℃培养16小时。

[0038] ②称取蛋白胨240g,牛肉膏45g,氯化钠45g,碳酸钙90g,葡萄糖360g,量取杜仲叶提取液115ml;先将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液115ml,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH为6.8后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,加入碳酸钙90g、葡萄糖360g,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌25min后迅速冷却到37℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌10分钟,37℃培养18小时即可。

[0039] 杜仲生物发酵固体培养基的制备:

杜仲叶40目粗粉80kg,构树叶40目粗粉60kg,苹果渣40目粗粉40kg,麸皮20kg,碳酸钙3kg,纯净水10kg;拌匀后置500L不锈钢固体发酵罐,控制灭菌温度120℃,灭菌时间30min,冷却至37℃,火焰法接种预先准备好的四级枯草芽孢菌发酵液10L,38℃固体发酵10h后再按火焰法接种预先准备好的四级地衣芽孢菌发酵液10L,38℃固体发酵10小时后,最后按火焰法接种预先准备好的四级粪肠球菌发酵液10L(此时,固体培养基中总水分含量约为15%~20%),38℃固体发酵,四级粪肠球菌接种后继续发酵22h。固体发酵全程中每隔4小时启动电动刮板搅拌一次,最后将固体发酵物料转入预热过的沸腾干燥机组,控制干燥温度40℃,干燥时间每批次约5小时,准确时间以送检样品水分含量≤7%为准(用快速水分测定仪检测水分含量),干燥后产品置不锈钢容器中密封加盖待检验合格后按500g/袋、30袋/箱进行分装和包装。

[0040] 最终产品,每克含活性枯草芽孢杆菌至少2个亿,每克含地衣芽孢杆菌至少1个亿,每克含粪肠球菌至少1个亿,含甘露聚糖肽≥200mg/kg,含绿原酸≥0.4%,京尼昔酸≥0.4%,总黄酮≥0.4%,含总糖≥12%,含蛋白质≥12%。

**[0041] 实施例2**

一种杜仲生物发酵复合菌饲料添加剂的制备方法,过程如下:

杜仲叶提取液的制备:将合格的杜仲新鲜干叶称取500克,先加水500ml浸润1小时,再加2500ml水进行第一次浸泡提取1小时,浸润和浸泡温度均为80℃,分离浸泡提取液,对分离出来的杜仲叶再加2000ml水进行第二次浸泡提取,浸泡温度80℃,浸泡时间1小时,合并两次浸泡提取液即得。

**[0042] 10L 四级枯草芽孢杆菌的发酵液的制备:**

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨90g,牛肉膏22.5g,氯化钠15g,硫酸铵1.5g,杜仲叶提取液38ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠和硫酸铵置于1000ml的纯净水中,加入杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH7.0后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml),250ml三角瓶中(每瓶175ml)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌30min后,冷却备用。

**[0043] 2)10L四级发酵液制备:**

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接枯草芽孢杆菌于一级试管中40℃培养24小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中40℃培养22小时,然后取发酵好的二级发酵液按5v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中40℃培养16小时。

②称取蛋白胨270g,牛肉膏67.5g,氯化钠45g,硫酸铵4.5g,杜仲叶提取液125ml。先将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠和硫酸铵置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH为7.0后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌30min后迅速冷却到37℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌10分钟,37℃培养24小时即可。

**[0045] 10L 四级地衣芽孢杆菌的发酵液的制备:**

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨90g,牛肉膏15g,氯化钠15g,杜仲叶提取液38ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于1000ml的纯净水中,加入38ml杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH7.0后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml),250ml三角瓶中(每瓶175ml)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌30min后,冷却备用。

**[0046] 2)10L四级发酵液制备:**

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接地衣芽孢杆菌于一级试管中39℃培养22小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中40℃培养22小时,然后取发酵好的二级发酵液按5v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中40℃培养16小时。

②称取蛋白胨270g,牛肉膏45g,氯化钠45g,量取杜仲叶提取液125ml;。先将称量

好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液125ml,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH为7.0后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌25min后迅速冷却到37℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌10分钟,37℃培养28小时即可。

[0048] 10L 四级粪肠球菌的发酵液的制备:

1)一二三级培养基制备:

①称取蛋白胨80g,牛肉膏15g,氯化钠15g,三级培养用碳酸钙10g,1-2培养级用乳糖8g,3级培养用葡萄糖40g,杜仲叶提取液38ml;

②将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于1000ml的纯净水中,加入38ml杜仲叶提取液,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH6.8后,用纯净水补充到3000ml;

③将上述制备好的培养基分装于Φ15×150mm试管中(每支9ml,预先加入0.4g乳糖),250ml三角瓶中(每瓶175ml,预先加入有7.6g乳糖)、3000ml圆底瓶中(每瓶1000ml,圆底烧瓶预先加入10gCaCO<sub>3</sub>、40g葡萄糖),包扎好置于灭菌锅中,120℃灭菌30min后,冷却备用。

[0049] 2)10L四级发酵液制备:

①取生产用斜面一支,按斜面转试管操作要求转接粪肠球菌于一级试管中39℃培养22小时,然后取发酵好的一级发酵液按5v%接种量接种到含有175ml二级培养液的三角瓶中40℃培养22小时,然后取发酵好的二级发酵液按5v%接种量接种到含有1000ml三级培养液的圆底烧瓶中37℃培养18小时。

[0050] ②称取蛋白胨240g,牛肉膏45g,氯化钠45g,碳酸钙90g,葡萄糖360g;先将称量好的蛋白胨、牛肉膏、氯化钠置于3L的纯净水中,加入杜仲叶提取液125ml,加热溶解,用20wt%NaOH或/和2N HCl调节pH为7.0后,全部转移到四级30L不锈钢发酵罐中,加入碳酸钙90g、葡萄糖360g,用水补充到9L,关闭发酵罐投料口,先用夹套升温到80℃后,两路或三路进蒸汽升温到120℃,保温120℃灭菌30min后迅速冷却到40℃后,火焰接种法转接三级发酵液1L,间隔1小时搅拌5分钟,40℃培养16小时即可。

[0051] 杜仲生物发酵固体培养基的制备:

杜仲叶40目粗粉80kg,构树叶40目粗粉60kg,苹果渣40目粗粉40kg,麸皮20kg,碳酸钙3kg,纯净水10kg;拌匀后置500L不锈钢固体发酵罐,控制灭菌温度120℃,灭菌时间30min,冷却至40℃,火焰法接种预先准备好的四级枯草芽孢菌发酵液10L,40℃固体发酵10h后再按火焰法接种预先准备好的四级地衣芽孢菌发酵液10L,40℃固体发酵10小时后,最后按火焰法接种预先准备好的四级粪肠球菌发酵液10L(此时,固体培养基中总水分含量约为15%~20%),40℃固体发酵,四级粪肠球菌接种后继续发酵24h。固体发酵全程中每隔4小时启动电动刮板搅拌一次,最后将固体发酵物料转入预热过的沸腾干燥机组,控制干燥温度44℃,干燥时间每批次约4小时,准确时间以送检样品水分含量≤7%为准(用快速水分测定仪检测水分含量),干燥后产品置不锈钢容器中密封加盖待检验合格后按500g/袋、30袋/箱进行分装和包装。

[0052] 最终产品,每克含活性枯草芽孢杆菌至少2个亿,每克含地衣芽孢杆菌至少1个亿,每克含粪肠球菌至少1个亿,含甘露聚糖肽≥200mg/kg,含绿原酸≥0.4%,京尼昔酸≥0.4%,总黄酮≥0.4%,含总糖≥12%,含蛋白质≥12%。

[0053] 上述产品在一般畜禽养殖中道添加量分别为饲料质量的2‰-3‰,疫情发生时加倍用量,特种养殖添加量是饲料质量的1%。

[0054] 奶牛养殖例证:对照组 灵宝市赵某4~7个月奶牛20头,正常饲养;实验组 灵宝市冯某4~7个月奶牛10头,在奶牛的饲料中添加2wt‰实施例1制得的添加剂,其他同对照组,饲养三个月后,发现实验组奶牛肠道疾病下降50-70%,产奶性能提高15-30%,乳蛋白含量比对照组高4.32%,有害物质黄曲霉毒素低于国标33%。

[0055] 蛋鸡和鸡蛋应用例证:从7日龄母鸡开始在鸡饲料中添加2wt‰实施例2制得的添加剂,其他同常规饲养方式,直至产蛋,蛋鸡和所产鸡蛋的各参数如下:

品名	蛋白质	氨基酸总量	脂肪	钙	抗生素和恩净、铅和总汞
蛋鸡	23%	17.87%	13.6%	5.72mg/100g	均未检出或低于国家标准 10倍以上
鸡蛋	12.5%	10.6%	8.6%	4.17mg/100g	均未检出或低于国家标准 10倍以上

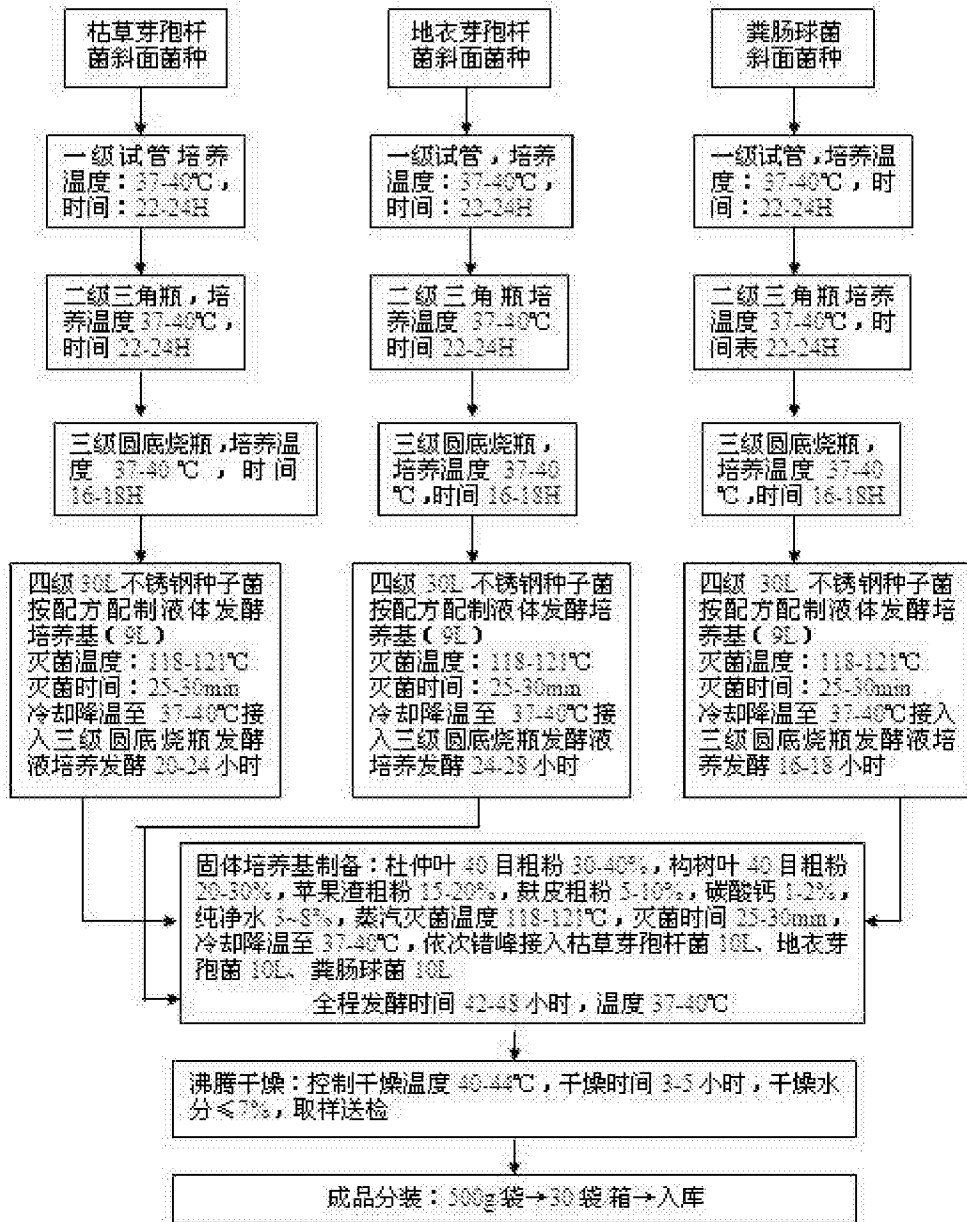


图1