

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A23K 1/16 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02104871.1

[45] 授权公告日 2008年6月4日

[11] 授权公告号 CN 100391357C

[22] 申请日 2002.2.26 [21] 申请号 02104871.1

[73] 专利权人 东莞市豪发生物工程开发有限公司
地址 523950 广东省东莞市厚街镇桥头管
理区

[72] 发明人 黄文彩 戚秀芳

[56] 参考文献

WO 0198474A1 2001.12.27

CN 1187312A 1998.7.15

WO 0132858A1 2001.5.10

WO 9903497A1 1999.1.28

审查员 石 军

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

细菌真菌混合发酵制取微生态制剂和复合酶
饲料添加剂

[57] 摘要

“细菌真菌混合发酵制取微生态制剂和复合酶
饲料添加剂”发明属于生物化学及微生物学领域。
地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和黑
曲霉混合接种，应用固体发酵机厚层通风发酵即可
获得既具有高质量的微生态制剂(活菌数 $\geq 8 \times 10^{10}$)
又具有多酶种、高酶活复合酶复合饲料添加
剂。该产品适用畜、禽、水产等人工养殖动物，可
提高饲料利用率，提高生产性能，降低成本，效益
显著。

1. 一种新型饲料添加剂,其特征在于:它由地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的1种和黑曲霉(*Aspergillus niger*)分别培养、混合接种发酵,细菌与真菌接种比为1:1,采用固体发酵机生产,一次发酵获得;上述四个菌种分别编号为HQ0101、HQ0102、HQ0103和HQ978,中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号分别为CGMCC NO: 0697、0698、0699、0696;且该添加剂中含有:(1)高含量微生态制剂,其活菌数 $\geq 8 \times 10^{10}$;(2)高活力复合酶,其含有酸性蛋白酶8000~10000 u/g、木聚糖酶60000~80000 u/g、纤维素酶18000~20000 u/g、 β -葡聚糖酶40000~60000 u/g、果胶酶18000~20000 u/g,该添加剂适用畜、禽、水产等人工养殖动物。

2. 如权利要求1所述的饲料添加剂的生产方法,其特征在于它包括菌种制备工艺和发酵工艺:菌种制备工艺特征是各种菌种分别制种,并均分为一、二、三级菌种,逐级放大培养菌种的工艺:

(I) 细菌菌种制备:

(1) 一级菌种:一级菌种由最原始斜面菌种扩繁而来,一支斜面菌种可扩接40-50支一级菌种,培养基为牛肉膏蛋白胨培养基,pH值为7.0-7.2,培养温度为35-36 $^{\circ}$ C,培养时间为48小时;

(2) 二级菌种:培养基,黄粉25%,豆粕25%,米糠29%,玉米粉20%,蔗糖1%,pH7.2-7.4,每个300ml玻瓶装10g,料水为1:0.8,121 $^{\circ}$ C灭菌,冷却,接入一级菌种,每支斜面接三瓶,搅匀,35-36 $^{\circ}$ C培养48小时;

(3) 三级菌种 培养基组成同二级菌种,每个22 \times 30cm塑料袋装90克湿料,121 $^{\circ}$ C灭菌30min,冷却,接入二级菌种孢子悬液25ml,该悬液为每只二级三角瓶种子瓶加水300ml洗下而得,摇匀,34-35 $^{\circ}$ C,培养48-50小时,供发酵生产使用;

(II)、黑曲霉菌种制备工艺也分为一、二、三级菌种制备:

(1) 一级菌种 一级菌种由最原始斜面菌种扩繁而来,一支斜面菌种可扩接30—40支一级菌种;培养基为PDA,自然pH值,培养温度28—30 $^{\circ}$ C,培养时间72小时;

(2) 二级菌种 培养基为麸皮,每个300ml三角瓶,装10g麸皮,料:水为1:0.6,121 $^{\circ}$ C灭菌30min,冷却<40 $^{\circ}$ C接一级菌种孢子悬液5ml,28—30 $^{\circ}$ C培养72—74小时;

(3) 三级菌种 培养基为麸皮豆粕,其比例为8:2,混匀,料:水为1:0.7,再混匀,装入22 \times 30cm塑料袋,每袋装90克混料,121 $^{\circ}$ C灭菌30min,冷却,接入二级菌孢子悬液15ml,该孢子悬液为每个二级菌三角瓶加水300ml把孢子液洗下而得,抖捏均匀,28 $^{\circ}$ C—30 $^{\circ}$ C培养72—74小时,供发酵生产使用;

(III). 发酵工艺的特征是:发酵培养基为麸皮65—75%,黄粉10—15%,豆粕13—15%,硫酸铵3—4%,磷酸二氢钾1—2%,自然pH;在固体发酵机厚层通风发酵或浅盘发酵方式生产,培养温度28—30 $^{\circ}$ C,发酵时间55—60h。

细菌真菌混合发酵制取微生态制剂和复合酶饲料添加剂

一、技术领域

本发明属于生物化学及微生物学领域。

目前，饲料资源日益紧缺，畜牧环境污染日趋严重，如何充分提高动物对饲料的利用率，减少饲料原料的浪费，并降低畜牧生产对环境的污染是急待解决的问题之一。其次，由于抗生素等药物饲料添加剂的广泛长期使用，导致对人致病性的细菌产生抗药性，在发达国家已经减少或禁止在饲料中应用抗生素作为生长促进剂。因此迫切要求寻找安全而有效的饲料添加剂，饲用酶制剂和微生态制剂作为替代抗生素的绿色饲料添加剂受到普遍关注。

二、背景技术

饲用酶制剂是应用现代生物工程技术，选用特殊微生物经发酵产生具有催化活性的生物化学产品，它对提高饲料转化率，拓宽饲料原料来源，提高动物生产性能，减少有机物和有害气体排放，经济效益和社会效益显著，饲用酶制剂的作用和使用效果已经得到动物营养学界和养殖业的普遍认同，因此，饲用酶制剂在我国近年来发展较快。

随着微生态理论在畜牧界的传播和应用，动物营养学界进行了大量微生态产品的应用研究，人们在配方营养的基础上，应用生态学原理，调整动物体内和环境中的微生物种类和数量，保持体内生态平衡和机体健康，激发消化吸收能力，强化机体免疫功能，达到防病抗病，提高生产性能的效果明显，因而微生态制剂使用日益普及。

但目前饲用酶制剂和畜用微生态制剂是分别生产，然后进行复配使用。本发明的目的就是将来酶制剂和微生态制剂分别生产的方法改为一次性同时生产，即获得既有高质量的复合酶制剂，又具有高品质的微生态制剂的复合产品的方法。

本发明的核心内容和特点：

1. 在黑曲霉一次发酵生产获得多酶种高酶活复合酶的方法基础上增加了三株抗逆性强的微生态制剂的生产菌种：地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌中的1种混合发酵生产。本发明所述三种细菌：地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* HQ0101)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* HQ0102)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* HQ0103)) 和一种真菌黑曲霉 (*Aspergillus niger* HQ978)。上述四种微生物均在

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏。其地址为北京中关村，保藏日期为2002年1月23日，保藏号分别为CGMCC NO: 0697、0698、0699、0696。

2. 微生物制剂和复合酶制剂混合发酵生产，减少了其中一种生产过程，降低了生产成本，并提高设备的利用率；

3. 产品质量稳定、优良，该添加剂中含有：(1) 高含量微生物制剂，其活菌数 $\geq 8 \times 10^{10}$ ；(2) 高活力复合酶，其含有酸性蛋白酶8000~10000 u/g、纤维素酶18000~20000 u/g、木聚糖酶60000~80000 u/g、 β -葡聚糖酶40000~60000 u/g、果胶酶18000~20000 u/g，该添加剂适用于畜、禽、水产等人工养殖动物。

三、发明内容

(一)、菌种制备工艺

1. 细菌菌种制备：分为三级菌种制备

(1) 一级菌种：一级菌种由最原始斜面菌种扩繁而来，一支斜面菌种可扩接40-50支一级菌种，培养基为牛肉膏蛋白胨培养基，pH值为7.0-7.2，培养温度为35-36℃，培养时间为48小时。

(2) 二级菌种：培养基，黄粉25%，豆粕25%，米糠29%，玉米粉20%，蔗糖1%，pH7.2-7.4，每个300ml玻瓶装10g，料水为1:0.8，121℃灭菌30min，冷却，接入一级菌种孢子悬5ml，搅匀，35-36℃培养48小时。

(3) 三级菌种 培养基组成同二级菌种。每个塑料袋(22×30cm)装90克湿料。121℃灭菌30min，冷却，接入二级菌种孢子悬液(该悬液为每只二级三角瓶种子瓶加水300ml洗下而得)25ml，摇匀，34-35℃，培养48-50小时，供发酵生产使用。

(二)、黑曲霉菌种制备工艺分为一、二、三级菌种制备。

(1) 一级菌种 一级菌种由最原始斜面菌种扩繁而来，一支斜面菌种可扩接30—40支一级菌种。培养基基为PDA，自然pH值，培养温度28—30℃，培养时间72小时。

(2) 二级菌种 培养基基为麸皮，每个300ml三角瓶，装10g麸皮，料：水为1:0.6，121℃灭菌30min，冷却 < 40℃接一级菌种孢子悬液5ml，28—30℃培养72—74小时。

(3) 三级菌种 培养基为麸皮豆粕，其比例为8:2，混匀，料：水为1:0.7，再混匀，装入塑料袋(22×30cm)，121℃灭菌30min，冷却，接入二级菌孢子悬液15ml，(该孢子悬液为每个二级菌三角瓶加水300ml把孢子液洗下而得)抖捏均匀，28℃—30℃培养72—74小时，供

发酵生产使用。

(二)、发酵生产

1. 发酵机 采用固体通风发酵机；每次投料（干基计）1000kg。
2. 发酵培养基配制 培养基为麸皮 65~75%，黄粉 10~15%，豆粕 13~15%，硫酸铵 3~4%，磷酸二氢钾 1~2%，自然 pH，先将麸皮、豆粕、米糠搅拌均匀，把硫酸铵和磷酸二氢钾溶入相当于干料 70%的自来水并喷入物料中，搅拌均匀，高压灭菌 40—50min。冷却备用。
3. 接种 以相当于发酵培养基干料 50%的无菌水洗涤细菌的三级菌种和黑曲霉三级菌种的孢子（细菌：真菌为 1：1）均匀喷入前项冷却发酵培养基。
4. 发酵 将接好菌种的物料投入经灭菌的发酵罐进行培养。设定温度 30—31℃，一般培养 20—24h，菌体生长良好结块，进行第一次翻料，以后视菌体生长结块情况而进行第二、三次翻料，以保持 3—5cm 的团块为宜。在第一、二次翻料时，若培养料水分<30%时可酌情喷入无菌水，利于菌体生长和产酶，发酵时间一般控制在 55—60h 结束发酵。

(三)、烘干和粉碎

出罐后，曲料经破碎机破碎，低温烘干，一般<45℃烘干至物料含水量 8—10%即可，然后粉碎，测定合格得成品。产品的活菌数 $\geq 8 \times 10^{10}$ ；酶种及酶活：酸性蛋白酶 8000~10000 u/g、纤维素酶 18000~20000 u/g、木聚糖酶 60000~80000 u/g、 β -葡聚糖酶 40000~60000 u/g、果胶酶 18000~20000 u/g。