

一种固态发酵苜蓿草粉饲料及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于饲料制备技术领域，具体涉及一种固态发酵苜蓿草粉饲料及其制备方法和应用。

背景技术

近年来，“人畜争粮”情况愈发严重，一方面由于人口数量不断增加，而耕地面积不断减少，加上饲料占粮食总产量的比例增量远大于粮食总产量自身增量；另一方面，畜牧业一直以来多以低纤维的谷物和动植物蛋白配制饲料，加之动物蛋白来源有限且价格昂贵。因此，开辟质优价廉的饲料原料的同时提高我国现有饲料资源的利用率是缓解这一矛盾的关键环节。众所周知，苜蓿为多年生优质豆科牧草，被誉为“牧草之王”，茎叶中含有丰富的蛋白质、矿物质、多种维生素及氨基酸，其作为植物蛋白质原料在配合饲料或混合饲料的应用前景广阔，但较高含量的纤维素也严重制约了其在饲料生产上的应用。因此，对苜蓿草粉进行固态发酵，降低纤维素含量的同时提高粗蛋白质含量，进而提高营养价值，以期达到降低饲料成本，缓解“人畜争粮”现状的目的。

目前，国内外学者对发酵苜蓿的研究较少。有限的研究中，苜蓿多被直接干燥后作为青干草或青贮饲料直接饲喂动物，但其粗纤维含量较高，加之动物体内缺乏降解纤维素的酶类，无法依靠自身降解纤维素，动物直接采食后导致养分消化率下降；也有部分研究会对其进行发酵后饲喂，但多采用单一菌株对苜蓿进行发酵，这种发酵后的苜蓿可大幅度提高其蛋白质含量尤其是可溶性蛋白质，但对纤维素等难降解物质分解效果较差，限制了其在畜牧业中的应用。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一种固态发酵苜蓿草粉饲料及其制备方法和应用。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一种固态发酵苜蓿草粉饲料，包含以下重量份的原料：苜蓿草粉 1~3 份、营养液 1~3 份、黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌培养液 0.18~0.54 份、热带假丝酵母菌悬液 0.06~0.18 份。

优选的，所述固态发酵苜蓿草粉饲料，包括以下重量份的原料：苜蓿草粉 1 份、营养液 1 份、黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液 0.18 份、热带假丝酵母菌悬液 0.06 份。

进一步的，所述苜蓿草粉饲料还包括螺旋藻粉 0.5~2 份、酵母硒 0.05~0.2 份和益生菌 1~2 份。

进一步的，所述营养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、 KH_2PO_4 1g、 CaCl_2 0.6g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 ZnSO_4 0.5g、 MnSO_4 0.5g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5g。

进一步的，所述黑曲霉-绿色木霉-粗糙链孢霉的复合菌培养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有黑曲霉(H)菌悬液 1mL、绿色木霉(L)菌悬液 1mL、粗糙链孢霉菌(C)菌悬液 1mL、葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。

优选的，所述复合菌培养液中孢子数为 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 。

进一步的，所述热带假丝酵母菌(J)培养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有热带假丝酵母菌悬液 1mL、蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。

优选的，所述热带假丝酵母菌培养液中孢子数为 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 。

说明书

第二个方面，本发明提供上述固态发酵苜蓿草粉饲料的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1，配制综合 PDA 培养基和麦芽汁琼脂培养基；

步骤 2，将黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)和粗糙链孢霉菌(C)分别接种至综合 PDA 培养基进行活化，以及将热带假丝酵母菌接种于麦芽汁琼脂培养基进行活化；活化后分别使用无菌水冲洗平板上的菌丝或孢子，即得单菌株菌悬液；

步骤 3，将黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)和粗糙链孢霉菌的单菌株菌悬液分别接种于液体培养基一中培养，将热带假丝酵母菌菌悬液接种于液体培养基二中培养，分别得到黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)、粗糙链孢霉菌(C)以及热带假丝酵母菌(J)的菌悬液，最后将黑曲霉菌、绿色木霉菌、粗糙链孢霉菌三种菌株的菌悬液混合成黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液；

步骤 4，将灭菌苜蓿草粉、营养液、黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液和热带假丝酵母菌悬液配料，先将黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液和营养液混匀，再加入到灭菌苜蓿草粉中混合均匀，得到混合发酵料；

步骤 5，将混合发酵料进行一次发酵，发酵结束后加入热带假丝酵母菌的培养液进行二次发酵，然后烘干既得。

进一步的，所述步骤 1 中综合 PDA 培养基的配制方法为：取 200g 土豆，洗净去皮切成小块，加水 1000mL 煮沸 25min；纱布过滤，得到土豆渗滤液，滤液加水补至 1000mL，得到质量体积比为 20%的马铃薯汁 1L，和葡萄糖 20g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、维生素 B1 8mg、琼脂 20g 混匀后加热溶解，溶解后于 121℃灭菌 30min，灭菌完毕后取出保温 50-60℃，静置冷却固化既得。

进一步的，所述步骤 1 中麦芽汁琼脂培养基的配制方法为：按质量分别称

说明书

取以下组分：蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g、琼脂 20g，称量完成后加入 1L 蒸馏水混匀，使用 pH-3C 型号的 pH 测定仪（上海精密科学仪器有限公司，上海）测定原始 pH 值，并使用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 6.2，加热溶解，溶解后于 121℃ 灭菌 30min，灭菌完毕后取出保温 50-60℃，静置冷却固化既得。

进一步的，所述液体培养基一的组成为：每 1L 蒸馏水中含有葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。

进一步的，所述液体培养基二的组成为：每 1L 蒸馏水中含有蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。

优选的，所述步骤 3 中培养的条件为：于 28℃ 恒温 160~170 r/min 振荡培养，待其孢子数量达到 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 后停止震荡。

优选的，所述步骤 4 中苜蓿灭菌的条件为：121℃ 灭菌 30min。

优选的，所述步骤 5 中一次发酵的条件为：先于 28℃ 发酵 2d，并且在 0h 时搅拌 1 次，之后每隔 12h 搅拌 1 次。

优选的，所述步骤 5 中二次发酵的条件为：于 28℃ 发酵 1d。

进一步的，所述步骤 5 中烘干温度为 35~45℃。

第三个方面，本发明提供上述固态发酵苜蓿草粉饲料及其制备方法在饲喂 28 日龄断奶仔猪中的应用。

本发明的有益效果体现在以下 3 点：

1) 本发明所选产纤维素酶的菌株分别为粗糙链孢霉、黑曲霉、绿色木霉，三种霉菌均属真菌界，外观均呈丝状，菌丝上布满大量孢子，生长过程中可产生较丰富的纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等酶类，有利于降解苜蓿中纤维素等不易被动物所利用的成分；与此同时，本发明所选热带假丝酵母菌可在发酵后期，利用发酵产物还原糖快速繁殖，同时产生大量的菌体蛋白；通过三种霉菌的协

说明书

同作用，可有效降解饲料中的纤维素含量，使纤维素含量由 25.31%降低至 23.25%；添加热带假丝酵母菌后，粗蛋白含量由 15.56%增加至 18.68%。既有效降解了苜蓿中纤维素含量，也增加了粗蛋白的含量，进而提高其在饲料中的应用价值，从而为个人和企业带来可观的经济效益。

2) 本发明与传统的利用单一菌株或添加酶制剂进行发酵相比，复合菌株通过协同作用能够产生丰富的胞外酶，同时也节约成本。

3) 本发明适用于大型养殖场、饲料厂的配套项目加以推广。

附图说明

图 1 为本发明实施例 2 中热带假丝酵母菌悬液的生长曲线。

图 2 为本发明实施例 2 中绿色木霉菌、黑曲霉菌和粗糙链孢霉菌菌悬液的生长曲线。

具体实施方式

本发明实施例采用的益生菌购自大益生物科技有限公司，其主要成分为双歧杆菌。

本发明实施例采用的黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)和热带假丝酵母菌(J)购自广东省微生物菌种保藏中心（菌种 GDM 编号分别为 3.576、3.141、2.6）。

本发明实施例采用的粗糙链孢霉、普通酵母菌和乳酸杆菌均购自北纳创联生物科技有限公司（菌种编号分别为 BNCC 336675、BNCC142268、BNCC106633）。

本发明实施例采用的苜蓿草粉指饲料原料苜蓿草粉，购置于宁夏固原宝发农牧有限责任公司，粒度大小为 6mm。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可

说明书

以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

最适降解纤维素的发酵菌株组合的筛选

本发明共选取3种菌株（黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)、粗糙链孢霉菌(C)）。共有7种组合，它们分别为H、L、C、HL、HC、LC、HLC，每种组合按照正交设计表接种于固态培养基对苜蓿草粉进行发酵，选取接种量、料水比、发酵时间、发酵温度为发酵因素，每个因素设置3个水平，采用 $L_9(3^4)$ 正交表（表2）进行四因素三水平的正交发酵试验，共9个组，每组3个重复。黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)、粗糙链孢霉菌(C)生长曲线如图2所示，培养72h后达到平台期，菌体干重达0.3841g。正交试验设计见表1和表2。

表1 正交试验设计

水平	A 接种量 (0%)	B 料水比 (W/V)	C 发酵时间 (d)	D 发酵温度 (°C)
1	4	1:0.8	2	26
2	5	1:1	3	27
3	6	1:1.2	4	28

注:A 表示接种量 (0%)，B 表示料水比 (W/V)，C 表示发酵时间 (d)，D 表示发酵温度 (°C)。

表 2 $L_9(3^4)$ 交互作用表

试验号	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3

说 明 书

5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

注:A 表示接种量 (0%), B 表示料水比 (W/V), C 表示发酵时间 (d), D 表示发酵温度 (°C), 大写字母对应数字表示试验水平。

按照上述实验设计将所得发酵产物放置于-80℃保存并测定其纤维素酶活, 随后分别在单菌落、双菌落、三菌落组合中挑选出纤维素酶活由高至低前三位测定其纤维素含量。

各菌株及菌株组合对发酵苜蓿草粉纤维素酶活及纤维素含量影响如表 3 所示。

表 3 各菌株及菌株组合对纤维素酶活及纤维素含量的影响

组别	纤维素酶活(U/ml)	粗纤维(%)	中性洗涤纤维 (%)	酸性洗涤纤维%
苜蓿草粉	9.69±0.4a	25.55±0.09d	38.85±0.91b	22.25±2.37b
发酵苜蓿草粉				
H7	44.42±0.78e	24.42±0.17cd	35.75±1.86ab	16.74±0.11a
H8	45.39±1.42ef	23.98±0.93bcd	35.21±0.8ab	17.2±0.19a
H9	40.57±2.83cde	22±0.48a	34.12±2.1a	16.81±0.07a
HL2	38.36±6.01cd	25.34±0.69d	35.08±0.84	16.24±1.64a
HL4	50.08±0.97f	24.72±0.76cd	35.27±1.5ab	16.7±0.41a
HL7	40.75±2.47cde	23.06±2.11abc	34.41±4.65a	16.7±0.19a
HLC1	35.9±5.07c	24.65±0.83cd	35.47±2.1ab	17.29±1.05a
HLC6	28.59±1.92b	23.75±0.92bcd	34.97±0.22a	17.18±0.34a
HLC8	43.04±1.1de	22.65±0.6ab	32.32±1.2a	15.84±1.24a
P 值	P<0.01	P<0.01	0.091	P<0.01

注:H 为黑曲霉菌, HL 为黑曲霉菌、绿色木霉菌组合, HLC 为黑曲霉菌、绿色木霉菌、粗糙链孢霉菌组合; H7、H8、H9 分别表示黑曲霉菌交互作用试验号(如

表 2 所示), 下同; 数值为三个重复的平均值计算; 同列数据肩标无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同。

试验结果表明, 与苜蓿草粉组相比, 发酵苜蓿组纤维素酶活性性极显著提高($P<0.01$), 其中双菌落组(HL)纤维素酶活性最高(HL4:50.08 U/mL), 其次是单菌落组中 H8 (45.39 U/ mL), 仅次于 HL4 组。此外, 单菌落组中 H9 的粗纤维(Crude Fiber, CF)、中性洗涤纤维(Neutral Detergent Fiber, NDF)、酸性洗涤纤维(Acid Detergent Fiber, ADF)含量均极显著降低($P<0.01$), 其中 CF 和 NDF 含量均为单菌落组中最低, 分别为 22.0%和 34.12%。双菌落组中 HL4 酶活性最高(50.08 U/mL), 但 HL7 的 CF 含量极显著降低($P<0.01$), NDF 含量显著降低($P<0.05$), 均为双菌落组中最低。三菌落组合(HLC)发酵中, 与苜蓿草粉组相比, HLC8 中纤维素酶活性极显著升高($P<0.01$), CF、ADF 含量均极显著降低($P<0.01$), 其中 CF、NDF 和 ADF 含量分别为 22.65%、32.32%、15.84%。综上所述, 拟选 H9、HL7、HLC8 菌种组合模式作为后续添加酵母的固态发酵模式。

实施例 2

最适产菌体蛋白的发酵菌株组合的筛选

如图 1 所示, 热带假丝酵母菌在培养 8h 后进入生长对数期, 24h 后达平台期, 菌落数达 2.76×10^8 CFU/mL。黑曲霉菌(H)、绿色木霉菌(L)、粗糙链孢霉菌(C)生长曲线如图 2 所示, 培养 72h 后达到平台期, 菌体干重达 0.3841g。根据四种菌生长曲线规律, 将上述 H9、HL7、HLC8 三种菌株组合, 按照实施例 1 的试验条件对苜蓿草粉重新发酵, 于发酵结束后立即加入热带假丝酵母菌悬液并搅拌混匀, 同时按照相同试验条件再发酵 1d, 所得发酵产物中粗蛋白质含量最高, 粗纤维含量最低组合, 即为最适发酵组合。

说明书

所述酵母菌悬液添加量、粗蛋白质、粗纤维等含量变化如表 4 所示。

表 4 不同固态发酵模式下发酵苜蓿草粉粗蛋白和粗纤维含量变化

项目	酵母量 (%)	粗蛋白质 (%)	粗纤维(%)	中性洗涤纤维(%)	酸性洗涤纤维(%)
苜蓿草粉	-	9.96±0.79a	25.31±0.25	40.5±0.85	21.63±1b
发酵苜蓿草粉					
H9+J	6	14.74±0.07b	21.86±2.12	39.24±0.56	19.85±0.58a
HL7+J	6	14.75±0.04b	24.14±1.66	39.68±0.49	20.38±0.33ab
HLC8+J	6	15.67±0.55b	23.25±0.96	39.43±0.59	21.39±0.52ab
P 值		P<0.01	0.18	0.28	0.08

注：“-”表示未添加或无；数值为三个重复的平均值计算。

由表 4 可知，与苜蓿草粉组相比，发酵苜蓿草粉组粗蛋白质含量极显著增加($P<0.01$)，其中 HLC8+J 中粗蛋白质含量最高，达到 15.67%，增加了 5.71%；酸性洗涤纤维呈下降趋势($P<0.1$)，其中 H9+J 酸性洗涤纤维含量最低(19.85%)，下降了 1.78%。三组粗纤维和中性洗涤纤维含量均未达到统计学显著水平($P>0.1$)。综上，拟选 HLC8+J 作为固态发酵苜蓿草粉的最佳菌种组合。

对比例 1

选取并按照上述实施例 1 中 HLC8 的试验条件重新发酵，HLC8+J 组、HLC8+普通酵母菌组和 HLC6+乳酸杆菌组在发酵后分别加入热带假丝酵母菌、普通酵母菌悬液和乳酸杆菌悬液并混匀，同时按照相同的试验条件发酵 1d；上述比对实施例 1 所得发酵产物粗蛋白质、粗纤维等成分的含量变化如表 5 所示。

表 5 添加不同酵母菌对粗蛋白质及粗纤维含量的影响

项目	添加量 (%)	粗蛋白质 (%)	粗纤维 (%)	中性洗涤纤维 (%)	酸性洗涤纤维 (%)
HLC8+J	5	15.67±0.55a	23.25±0.96a	39.43±0.59	21.39±0.52

说 明 书

HLC8+普通酵母菌	5	12.58±0.46b	25.3±0.6b	38.59±0.51	21.52±0.14
HLC8+乳酸杆菌	5	11.6±0.54b	25.48±0.37b	38.14±1.44	21.37±0.41
P 值		P<0.001	0.03	0.433	0.915

注：“-”表示未添加或无；“HLC8+J”表示复合菌悬液发酵 2d+热带假丝酵母菌悬液发酵 1d；“（HLC8+普通酵母菌）和（HLC8+乳酸杆菌）”分别表示复合菌悬液发酵 2d+普通酵母菌 1d，复合菌悬液发酵 2d+乳酸杆菌 1d。

表 5 表明，与 HLC8+J 组相比，HLC8+普通酵母菌组和 HLC8+乳酸杆菌组粗蛋白质含量显著降低($P<0.001$)，粗纤维含量显著增加($P<0.05$)。综上，本实验条件下，选取热带假丝酵母菌作为最适产粗蛋白质菌株。

实施例 3

在挑选出菌种组合（HLC8+J）后，本实施例提供一种固态发酵苜蓿草粉饲料，包括以下重量份的原料：苜蓿草粉 1 份、营养液 1 份、黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液 0.18 份、热带假丝酵母菌悬液 0.06 份。其中，所述营养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、 KH_2PO_4 1g、 CaCl_2 0.6g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 ZnSO_4 0.5g、 MnSO_4 0.5g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5g。所述黑曲霉-绿色木霉-粗糙链孢霉的复合菌培养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有黑曲霉（H）菌悬液 1mL、绿色木霉(L)菌悬液 1mL、粗糙链孢霉菌(C)菌悬液 1mL、葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。所述复合菌培养液种孢子数为 1×10^6 CFU/mL。所述热带假丝酵母菌(J)培养液的组成为：每 1L 蒸馏水中含有热带假丝酵母菌悬液 1mL、蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。所述热带假丝酵母菌培养液中孢子数为 1×10^6 CFU/mL。

该固态发酵苜蓿草粉饲料的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1，配制综合 PDA 培养基和麦芽汁琼脂培养基；其中综合 PDA 培养基

说明书

的配制方法为：取 200g 土豆，洗净去皮切成小块，加水 1000mL 煮沸 25min；纱布过滤，得到土豆渗滤液，滤液加水补至 1000mL，得到质量体积比为 20% 的马铃薯汁 1L，和葡萄糖 20g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、维生素 B1 8mg、琼脂 20g 混匀后加热溶解，溶解后于 121℃ 灭菌 30min，灭菌完毕后取出保温 50-60℃，静置冷却固化既得。麦芽汁琼脂培养基的配制方法为：按质量分别称取以下组分：蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g、琼脂 20g，称量完成后加入 1L 蒸馏水混匀，使用 pH-3C 型号的 pH 测定仪（上海精密科学仪器有限公司，上海）测定原始 pH 值，并使用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 6.2，加热溶解，溶解后于 121℃ 灭菌 30min，灭菌完毕后取出保温 50-60℃，静置冷却固化既得。

步骤 2，将黑曲霉菌、绿色木霉菌和粗糙链孢霉菌分别接种至综合 PDA 培养基进行活化，以及将热带假丝酵母菌接种于麦芽汁琼脂培养基进行活化；活化后分别使用无菌水冲洗平板上的菌丝或孢子，即得单菌株菌悬液一。

步骤 3，将黑曲霉菌、绿色木霉菌和粗糙链孢霉菌的单菌株菌悬液分别接种于液体培养基一中于 28℃ 恒温 160~170 r/min 振荡培养，待其孢子数量达到 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 后停止震荡，分别得到黑曲霉菌、绿色木霉菌、粗糙链孢霉菌单菌株菌悬液二，再将以上三种单菌悬液混匀，得到黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液；并将热带假丝酵母菌菌悬液接种于液体培养基二中于 28℃ 恒温 160~170 r/min 振荡培养，待其孢子数量达到 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 后停止震荡，得到热带假丝酵母菌悬液；其中，所述液体培养基一的组成为：每 1L 蒸馏水中含有葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。所述液体培养基二的组成为：每 1L 蒸馏水中含有蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。

说明书

步骤 4，将苜蓿草粉于 121℃ 灭菌 30min，先将黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液和营养液混匀，再加入至灭菌苜蓿草粉中混合均匀，得到混合发酵料。

步骤 5，将混合发酵料进行一次发酵，一次发酵的条件为：先于 28℃ 发酵 2d，并且在 0h 时搅拌 1 次，之后每隔 12h 搅拌 1 次。发酵结束后加入步骤 3 得到的热带假丝酵母菌的培养液进行二次发酵，二次发酵的条件为：于 28℃ 发酵 1d。发酵结束后于 60~70℃ 烘干。

苜蓿草粉发酵前后的营养成分变化情况

测定本实施例获得的发酵苜蓿草粉中粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、干物质、总能的含量，结果如表 6 所示。

粗蛋白的测定：采用 GB/T 6432-2018 测定粗蛋白质的含量。

粗纤维的测定：采用 GB/T 6434-2006 测定粗纤维的含量。

粗脂肪的测定：采用 GB/T6433-2006 测定粗脂肪的含量。

中性洗涤纤维的测定：采用 GB/T 20806-2006 测定中性洗涤纤维的含量。

酸性洗涤纤维的测定：采用 NY/T 1459-2007 测定酸性洗涤纤维的含量。

表 6 本实施例获得的发酵苜蓿草粉饲料以及苜蓿草粉营养成分表

项目	苜蓿草粉	发酵苜蓿草粉
干物质 (%)	89.33	96.09
粗蛋白质 (%)	15.56	18.68
能量 (cal/kg)	3788.41	4075.80
粗脂肪 (%)	1.71	1.89
粗纤维 (%)	25.31	23.25
中性洗涤纤维 (%)	40.50	39.43
酸性洗涤纤维 (%)	21.63	21.39

注：数值均为三个重复的平均值计算；

本实施例获得的发酵苜蓿饲料发酵前后主要营养成分含量变化如表 6 所示, 发酵后发酵苜蓿干物质、粗蛋白质、粗脂肪及总能含量均增加, 粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量均下降。综上所述, 利用复配菌剂发酵苜蓿有助于提高营养品质。

实施例 4

本实施例提供一种固态发酵苜蓿草粉饲料, 包括以下重量份的原料: 苜蓿草粉 1 份、营养液 1 份、黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液 0.18 份、热带假丝酵母菌悬液 0.06 份, 螺旋藻粉 0.5~2 份、酵母硒 0.05~0.2 份和益生菌 1~2 份。其中, 所述营养液的组成为: 每 1L 蒸馏水中含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、 KH_2PO_4 1g、 CaCl_2 0.6g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 ZnSO_4 0.5g、 MnSO_4 0.5g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5g。所述黑曲霉-绿色木霉-粗糙链孢霉的复合菌培养液的组成为: 每 1L 蒸馏水中含有黑曲霉(H)菌悬液 1mL、绿色木霉(L)菌悬液 1mL、粗糙链孢霉菌(C)菌悬液 1mL、葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。所述复合菌培养液种孢子数为 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 。所述热带假丝酵母菌(J)培养液的组成为: 每 1L 蒸馏水中含有热带假丝酵母菌悬液 1mL、蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。所述热带假丝酵母菌培养液中孢子数为 $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 。

该固态发酵苜蓿草粉饲料的制备方法, 包括以下步骤:

步骤 1, 配制综合 PDA 培养基和麦芽汁琼脂培养基; 其中综合 PDA 培养基的配制方法为: 取 200g 土豆, 洗净去皮切成小块, 加水 1000mL 煮沸 25min; 纱布过滤, 得到土豆渗滤液, 滤液加水补至 1000mL, 得到质量体积比为 20% 的马铃薯汁 1L, 和葡萄糖 20g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、维生素 B1 8mg、琼脂 20g 混匀后加热溶解, 溶解后于 121°C 灭菌 30min, 灭菌完毕后取出保温 $50\text{--}60^\circ\text{C}$, 静置冷却固化既得。麦芽汁琼脂培养基的配制方法为: 按质量分别称

取以下组分：蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g、琼脂 20g，称量完成后加入 1L 蒸馏水混匀，使用 pHS-3C 型号的 pH 测定仪（上海精密科学仪器有限公司，上海）测定原始 pH 值，并使用 1mol/LNaOH 调节 pH 至 6.2，加热溶解，溶解后于 121℃ 灭菌 30min，灭菌完毕后取出保温 50-60℃，静置冷却固化既得。

步骤 2，将黑曲霉菌、绿色木霉菌和粗糙链孢霉菌分别接种至综合 PDA 培养基进行活化，以及将热带假丝酵母菌接种于麦芽汁琼脂培养基进行活化；活化后分别使用无菌水冲洗平板上的菌丝或孢子，即得单菌株菌悬液一。

步骤 3，将黑曲霉菌、绿色木霉菌和粗糙链孢霉菌的单菌株菌悬液分别接种于液体培养基一中于 28℃ 恒温 160~170 r/min 振荡培养，待其孢子数量达到 1×10^6 CFU/mL 后停止震荡，分别得到黑曲霉菌、绿色木霉菌、粗糙链孢霉菌单菌株悬液二，再将以上三种单菌悬液混匀，得到黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液；并将热带假丝酵母菌菌悬液接种于液体培养基二中于 28℃ 恒温 160~170 r/min 振荡培养，待其孢子数量达到 1×10^6 CFU/mL 后停止震荡，得到热带假丝酵母菌悬液；其中，所述液体培养基一的组成为：每 1L 蒸馏水中含有葡萄糖 10g、可溶性淀粉 15g、蛋白胨 0.75g、 KH_2PO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g、 MgSO_4 0.75g。所述液体培养基二的组成为：每 1L 蒸馏水中含有蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、酵母粉 3g、麦芽提取物 3g。

步骤 4，将苜蓿草粉于 121℃ 灭菌 30min，然后和螺旋藻粉、酵母硒、益生菌混合均匀，先将黑曲霉菌-绿色木霉菌-粗糙链孢霉菌的复合菌悬液和营养液混匀，再加入到灭菌苜蓿草粉等的混合物中混合均匀，得到混合发酵料。

步骤 5，将混合发酵料进行一次发酵，一次发酵的条件为：先于 28℃ 发酵 2d，并且在 0h 时搅拌 1 次，之后每隔 12h 搅拌 1 次。发酵结束后加入步骤 3 得

说明书

到的热带假丝酵母菌的培养液进行二次发酵，二次发酵的条件为：于 28℃发酵 1d。发酵结束后于 40℃烘干。

苜蓿草粉发酵前后的营养成分变化情况

测定本实施例获得的发酵苜蓿草粉中粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、干物质、总能的含量，结果如表 7 所示。

粗蛋白的测定：采用 GB/T 6432-2018 测定粗蛋白质的含量。

粗纤维的测定：采用 GB/T 6434-2006 测定粗纤维的含量。

粗脂肪的测定：采用 GB/T6433-2006 测定粗脂肪的含量。

中性洗涤纤维的测定：采用 GB/T 20806-2006 测定中性洗涤纤维的含量。

酸性洗涤纤维的测定：采用 NY/T 1459-2007 测定酸性洗涤纤维的含量。

表 7 本实施例获得的发酵苜蓿草粉饲料以及苜蓿草粉营养成分表

项目	苜蓿草粉	实施例 3 的发酵苜蓿草粉	实施例 4 的发酵苜蓿草粉
干物质 (%)	89.33	96.09	97.06
粗蛋白质 (%)	15.56	18.68	20.21
能量 (cal/kg)	3788.41	4075.80	4735.32
粗脂肪 (%)	1.71	1.89	2.32
粗纤维 (%)	25.31	23.25	22.12
中性洗涤纤维 (%)	40.50	39.43	38.11
酸性洗涤纤维 (%)	21.63	21.39	20.76

注：数值均为三个重复的平均值计算；

本实施例获得的发酵苜蓿饲料发酵前后主要营养成分含量变化如表 7 所示，发酵后发酵苜蓿干物质、粗蛋白、粗脂肪及总能含量均增加，粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量均下降。综上所述，利用复配菌剂发酵苜蓿有助于提高营养品质。

说明书

实施例 5

发酵苜蓿饲料中真菌毒素含量检测。

真菌毒素含量标准参照 GB13078-2017，检测方法参照酶联免疫法，检测结果如表 8 所述。

表 8 苜蓿发酵前后真菌毒素含量变化

项目	苜蓿草粉	实施例 3	实施例 4	限量	判断
黄曲霉毒素,ug/kg	3.17	2.40	2.41	≤30	合格
赭曲霉毒素,ug/kg	23.84	11.88	11.98	≤100	合格
玉米赤霉烯酮,mg/kg	0.23	0.46	0.35	≤1	合格
呕吐毒素,mg/kg	0.24	0.18	0.18	≤5	合格
T-2 毒素,mg/kg	0.01	0.01	0.01	≤0.5	合格
伏马毒素(B1+B2),mg/kg	0.00	0.05	0.02	≤60	合格

注：数值为三个重复的平均值计算；实测浓度小于限量为合格。

实施例 6

本发明的无抗发酵苜蓿饲料对断奶仔猪生长性能和腹泻率的影响

1.试验管理

动物试验在四川农业大学动物试验基地进行。饲养试验开始前，首先对仔猪舍（包括工具）进行彻底冲洗、熏蒸、消毒和通风。仔猪试验期间自由采食和饮水，每天在 08:00、14:00 和 20:00 进行饲喂。少喂勤添，保证自由采食。饲养温度控制在 24℃左右，湿度保持在 65%左右。试验初、末期对猪只进行空腹称重并记录，每天记录采食量，每天早晚两次观察仔猪粪便情况，记录每个处理腹泻仔猪头次。最后以每个处理仔猪发生腹泻的头次数除以该处理总的饲养数(该处理仔猪头数×饲养天数)，计算腹泻率（当腹泻评分为 2 或以上，认为仔

说明书

猪发生腹泻)，试验过程未使用任何药物和抗生素。预试验 5-7 天，正式试验期为 40 天。

腹泻率=试验期腹泻仔猪头次 / (试验仔猪头数×试验天数)×100%。

2. 试验设计

选取 21 头初始体重为 (7.2 ± 0.5) kg 的 28 日龄健康雄性断奶杜洛克×长白×约克仔猪，采用单因子试验设计，按照体重无差异原则随机分为 3 个处理，每个处理 7 个重复，每个重复 1 头猪，单笼饲养。对照组饲喂基础日粮，不额外添加日粮纤维。处理 I 在基础日粮中添加 8% 普通苜蓿草粉饲料；处理 II 在基础日粮中添加 8% 实施例 3 制备的发酵苜蓿草粉；处理 III 在基础日粮中添加 8% 实施例 4 制备的发酵苜蓿草粉。参照 NRC（2012）和中国猪饲养标准配制玉米-豆粕型饲料。试验设计与处理见表 9。

表 9 断奶仔猪试验分组及日粮类型

分组	饲料
对照组	基础日粮
处理 I	基础日粮+8% 普通苜蓿草粉
处理 II	基础日粮+8% 发酵苜蓿草粉
处理 III	基础日粮+8% 实施例 4 发酵苜蓿草粉

3. 试验日粮

基础日粮的组成及营养水平如表 10 所示。

表 10 日粮组成及营养水平（风干基础）

项目	对照组	处理组	
		苜蓿草粉	发酵苜蓿草粉
成分，%			
膨化玉米，（CP 7.8%）	37.19	29.99	29.99
去皮大豆粕，（CP47.9%）	20.55	20.55	20.55

说 明 书

玉米淀粉	18.00	18.00	18.00
鱼粉 ，（CP 60.2%）	4.50	4.50	4.50
大豆浓缩蛋白 ，（CP62.92%）	4.30	3.50	2.50
乳清粉	5.50	5.50	5.50
蔗糖	4.00	4.00	4.00
葡萄糖	3.00	3.00	4.00
豆油	0.20	0.20	0.20
苜蓿草粉	—	800	—
发酵苜蓿草粉	—		8.00
氯化钠	0.30	0.30	0.30
赖氨酸盐酸盐，（78%）	0.40	0.40	0.40
DL-蛋氨酸	0.15	0.15	0.15
苏氨酸，（98.5%）	0.14	0.14	0.14
色氨酸，（98.0%）	0.03	0.03	0.03
石粉	0.60	0.60	0.60
磷酸氢钙	0.80	0.80	0.80
氯化胆碱	0.10	0.10	0.10
维生素预混料 ¹	0.04	0.04	0.04
矿物元素预混料 ²	0.20	0.20	0.20
合计	100.00	100.00	100.00
营养水平 ³			
DE，（Mcal/kg）	3.53	3.58	3.55
CP，（%）	18.92	18.72	18.58
Ca，（%）	1.00	0.80	0.79
TP，（%）	0.63	0.56	0.56
AP，（%）	0.43	0.40	0.40
D-lys	1.44	1.36	1.33
D-Met	0.45	0.44	0.43
D-Met+D-Cys	0.66	0.68	0.67
D-Thr	0.86	0.83	0.81
D-Trp	0.28	0.21	0.2

说 明 书

CF	1.95	3.83	3.64
NDF	5.49	8.07	7.88
ADF	2.66	4.15	3.98

1) 维生素预混料为每千克日粮提供: Vitamin A 30000000 IU, Vitamin D₃ 10000000 IU, Vitamin E 80000 IU, Vitamin K₃ 10000 mg, Vitamin B₁ 10000 mg, Vitamin B₂ 25000 mg, Vitamin B₆ 12000 mg, Vitamin B₁₂ 120 mg, D-泛酸 50000 mg, 叶酸 5000 mg, D-生物素 biotin 500 mg。

2) 7-25 kg阶段矿物质预混料可为每千克日粮提供: 350mg Fe (FeSO₄ ·4H₂O), 41.67mg Cu (CuSO₄ ·5H₂O), 292.78mg Zn (ZnSO₄ ·7H₂O), 66.20 mg Mn (MnSO₄ ·H₂O), 8.31 mg I (KI), 30.61mg Se (Na₂SeO₃), 1209.55mg CaCO₃

3)营养水平中消化能、粗蛋白、粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、钙、有效磷、赖氨酸、蛋氨酸均为计算值。

4.试验结果

(1) 本发明的饲料有效降低断奶仔猪腹泻率, 结果如表 11 所示。

表 11 苜蓿对断奶仔猪生长性能和腹泻率的影响

项目	对照组	苜蓿草粉	实施例3的发酵苜蓿草粉	实施例4的发酵苜蓿草粉	P 值
平均初始重(Kg)	7.18±0.14	7.21±0.14	7.19±0.11	7.20±0.02	0.99
平均末重(Kg)	24.34±0.80	23.92±0.80	23.08±0.59	24.90±0.12	0.37
ADFI (g)	704.01±19.25	726.02±14.40	706.74±18.43	716.19±1.79	0.73
ADG (g)	428.85±18.78	418.11±20.74	397.20±14.70	442.64±3.35	0.35
F/G	1.58±0.13a	1.67±0.02	1.71±0.02	1.61±0.01	0.06
腹泻率(%)	8.25±2.18	7.22±1.76	4.50±2.31	4.46±1.26	0.76

由表 11 可知, 与对照相比, 苜蓿草粉组与发酵苜蓿草粉组 ADG 和 F/G 无显著变化, 但与对照组和苜蓿草粉组相比, 发酵苜蓿草粉组仔猪腹泻率分别降

说明书

低了 3.75%-3.79%和 2.72%-2.76%。上述结果说明，添加 8%发酵苜蓿草粉在不影响仔猪生长性能的基础上降低其腹泻率，促进其肠道健康。

(2) 本发明的饲料增加断奶仔猪小肠杯状细胞数量，结果如表 12 所示。

表 12 发酵苜蓿对断奶仔猪小肠杯状细胞数量的影响

项目	对照组	苜蓿草粉	实施例 3 的发酵苜蓿	实施例 4 的发酵苜蓿	P 值
十二指肠 (个/mm)	27.52±3.51	17.05±2.51	23.65±2.53	25.23±1.25	0.23
空肠 (个/mm)	17.86±1.76	14.00±3.05	22.15±1.84	23.16±1.21	0.10
回肠 (个/mm)	27.41±4.70	19.32±2.19	28.26±2.74	30.12±0.98	0.35

由表 12 可知，与苜蓿草粉组相比，饲喂实施例 3 和 4 的发酵苜蓿草粉后，仔猪十二指肠杯状细胞数量分别增加 6.6 和 8.18 个/mm，空肠杯状细胞数量分别增加 8.15 和 9.16 个/mm，回肠杯状细胞数量分别增加 9.03 和 10.89 个/mm；与对照组相比，饲喂实施例 3 和 4 的发酵苜蓿草粉后，仔猪空肠杯状细胞数量分别增加 4.29 和 5.3 个/mm，回肠杯状细胞数量分别增加 0.85 和 2.71 个/mm。杯状细胞的主要功能是分泌粘液素，维持肠道粘膜屏障的完整性。上述结果表明本发明的发酵苜蓿饲料对保护仔猪小肠上皮物理屏障更为有利，一定程度降低其肠上皮受病原微生物侵袭的几率。

(3) 本发明的饲料显著降低断奶仔猪结肠食糜中的肠毒性微生物及其毒力因子的含量，结果如表 14 所示。

表 14 本发明的饲料对断奶仔猪结肠食糜特定菌群数量的影响[log(拷贝数/g)]

菌种/毒力因子	对照	苜蓿草粉	实施例 3 的发酵苜蓿草粉	实施例 4 的发酵苜蓿草粉	SEM	P 值
大肠杆菌 E.coli	6.12±0.88b	6.04±0.44ab	5.88±0.56ab	5.41±0.08a	0.12	0.12
沙门氏菌 Samongella.spp	9.6±0.9b	9.52±0.45b	9.36±0.57b	8.19±0.03a	0.12	0.00
肠杆菌科 Enterobacteriaceae family	5.71±1.33	5.51±0.92	5.66±0.86	5.14±0.02	0.19	0.64

说 明 书

热稳定肠毒素 astA	9.6±0.9	9.52±0.45	9.36±0.57	9.12±0.03	0.12	0.42
毒力基因 STa STa	8.31±0.55b	7.74±0.45ab	7.82±1.17ab	7.20±0.02a	0.15	0.00
毒力基因 STa STa	6.61±0.49b	6.55±0.66b	5.83±0.58a	5.30±0.07a	0.12	0.02

表 14 展示了特定菌群及相关毒力因子的 real-time PCR 结果。与对照组相比，实施例 3 的发酵苜蓿草粉显著降低了断奶仔猪结肠大肠杆菌肠毒素 STb 表达量($P<0.05$)；实施例 4 的发酵苜蓿草粉显著降低了仔猪结肠大肠杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌肠毒素 STa 以及大肠杆菌肠毒素 STb 的数量($P<0.05$)。上述结果表明本发明的发酵苜蓿饲料直接降低猪肠道中的有害菌数量及其毒力因子含量，有利于仔猪肠道微生物态平衡，降低肠道疾病风险。以一个万头猪场（年出栏肥猪 10000 头）为例，现有商品配合料一般为玉米-豆粕型，按发酵小麦麸替代 8%玉米（成本为 2000 元/吨）计算，本发明的发酵苜蓿成本为 1300 元/吨，每头猪从断奶到出栏平均约耗料 370 kg，按玉米添加量平均为 60%，则每头猪节约饲料成本 12.5 元，一个万头猪场每年至少节约饲料成本 12.5 万元；此外，使用本发明的发酵苜蓿饲料后明显降低仔猪腹泻率，可以预测其能提高仔猪抗病力，节约用药成本或降低仔猪死淘率，潜在经济和社会效益巨大。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。