

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.04.024

# 降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇直投菌剂 发酵制备工艺研究及初步应用

杜 稳<sup>1</sup>, 常晓娇<sup>1</sup>, 赵一凡<sup>1</sup>, 管玉龙<sup>2</sup>, 孙长坡<sup>1</sup>, 刘虎军<sup>1</sup>

(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京, 100037;

2. 安徽古井贡股份有限公司, 安徽省 亳州, 236800)

**摘要:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 是镰刀菌的次级代谢产物, 危害粮食及饲料产业。在 5L-四联发酵罐中, 对一株可以高效降解 DON 的枯草芽孢杆菌 ASAG-35 进行发酵, 研究 pH、温度、补料碳源以及发酵时间等工艺参数, 以提高枯草芽孢杆菌的产芽孢能力。最佳发酵工艺条件为: pH 控制在 7.5, 温度分阶段控制, 发酵前 12 h 控制温度 37 °C, 12 h 后提高温度到 39 °C 直至发酵结束, 在发酵第 12 h 一次性补加 10 g/L 的糖蜜, 30 h 后终止发酵; 在最优条件下, 芽孢数可达到  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/mL, 芽孢率可达到 96.7%。进一步将该发酵液制成直投菌剂并初步应用于粮食加工副产物中 DON 的脱除, 当复合物料培养基中干物质含量  $\leq 30\%$ , 菌剂接入量  $\geq 0.1\%$  时, 菌剂发酵可有效脱除粮食副产物中的 DON 毒素, 最高降解率为 98.8%。

**关键词:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 枯草芽孢杆菌; 发酵调节优化; 芽孢率; 粮食副产物中 DON 脱毒  
中图分类号: Q815; TS210.9 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)04-0152-07

网络首发时间: 2020-06-17 13:32:28

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20200617.1024.007.html>

## Research of fermentation preparation technology and preliminary application for Deoxynivalenol-degrading direct inoculated microbial inoculum

DU Wen<sup>1</sup>, CHANG Xiao-jiao<sup>1</sup>, ZHAO Yi-fan<sup>1</sup>, GUAN Yu-long<sup>2</sup>, SUN Chang-po<sup>1</sup>, LIU Hu-jun<sup>1</sup>

(1. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China;

2. Anhui Gujing gongjiu Co., Ltd., Bozhou, Anhui 236800, China)

**Abstract:** Deoxynivalenol (DON), as a secondary metabolite of some fusarium species, has been harmful to the food and feed industry. To improve spore-producing ability of *Bacillus subtilis*, the fermentation pH, temperature, supplemental carbon source and duration of *Bacillus subtilis* that efficiently degraded DON were studied in 5L-quadruple fermenters. The best fermentation conditions were determined, the fermentation pH was controlled at 7.5 and the temperature was controlled by stages, kept at 37 °C for first 12 hours, then raised to 39 °C until the end; 10 g/L molasses was added once at the 12<sup>th</sup> hour, then the fermentation was terminated at the 30<sup>th</sup> hour. Under the optimal conditions, the number of spores could reach  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/mL and the spores' rate could reach 96.7%. The fermentation liquid were further prepared into direct inoculated microbial inoculum and applied to remove DON from grain processing by-products; Under the condition that dry matter content in the composite material culture medium was not more than 30%, and the inoculation amount of the bacterium preparation was more than 0.1%, DON in the grain by-products could be effectively removed by fermentation and the highest degradation rate could reach 98.8%.

收稿日期: 2020-03-05

基金项目: 国家自然科学基金 (U1604234); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZX1903-4)

作者简介: 杜稳, 男, 1989 年出生, 助理研究员, 研究方向为真菌毒素污染粮食的安全合理利用。

通讯作者: 刘虎军, 男, 1986 年出生, 助理研究员, 研究方向为真菌毒素污染粮食的安全合理利用。

**Key words:** Deoxynivalenol; *Bacillus subtilis*; optimization of fermentation conditions; spores rate; DON detoxification of grain by-products

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)又名呕吐毒素,是一种单端孢霉烯族毒素,主要是由禾谷镰刀菌和粉红镰刀菌产生的一种剧毒次级代谢产物。谷类作物在生长、收割、仓储、加工、运输、销售等诸多环节均可能发生霉变,从而产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇<sup>[1-2]</sup>。脱氧雪腐镰刀菌烯醇一方面使饲料行业蒙受巨大损失,另一方面,可导致畜禽食欲废绝、发育受阻、代谢紊乱、免疫失调,造成母畜不孕、孕畜流产,胎儿异常等繁殖性能障碍,对畜牧业造成严重破坏<sup>[3-5]</sup>。目前, DON 的脱除方法有吸附法、紫外法、生物降解法等,而生物降解法可通过微生物释放胞外酶作用于 DON,使其转化为低毒或无毒的代谢产物,具有彻底,无二次污染的特点。程亮等<sup>[6]</sup>通过筛选得到可以降解 DON 的假单孢菌,徐剑宏等<sup>[7]</sup>通过筛选得到可以降解 DON 的德沃斯氏菌,李晓凤等<sup>[8]</sup>通过筛选得到降解 DON 的肠杆菌,谭剑等<sup>[9]</sup>通过筛选鉴定得到一株枯草芽孢杆菌可有效降解 DON。由此可见,生物降解法因其具有高效针对性,环境友好性等特点,正广泛受到关注。

枯草芽孢杆菌是在自然界中广泛存在的一种好氧性产芽孢杆菌<sup>[10]</sup>,它具有很强的脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶等酶活性,代谢旺盛,对人畜无害,不污染环境,是很好的生物防控菌。芽孢具有耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂等多种抗逆性,在工业发酵生产的过程中,需要提高芽孢的生成率,以保证后期产品的活性,郭夏丽,王法富等<sup>[11-12]</sup>通过摇瓶对产芽孢的培养基和发酵参数进行了初步优化,确定培养基配方和摇瓶发酵参数,但缺乏系统的发酵罐制备工艺研究。芽孢一般被加工成菌剂并且应用于多种领域,曹丁等<sup>[13]</sup>用产抗菌肽芽孢杆菌的菌剂作为饲料添加剂应用于仔猪生产,减少仔猪腹泻,提高断奶仔猪的成活率;刘年浪等<sup>[14]</sup>用枯草芽孢杆菌菌剂应用于黄瓜枯萎病防治,使黄瓜显著增产;肖伟等<sup>[15]</sup>将枯草芽孢杆菌菌剂应用于小麦种子贮藏,在一定程度上抑

制了真菌病害对小麦的污染。目前,对芽孢杆菌直投发酵剂制备工艺进行研究并应用于粮食副产物的真菌毒素生物降解,鲜有报道。

在前期的工作中,我们筛选鉴定得到一株可以高效降解 DON 的枯草芽孢杆菌 ASAG-35,并对其进行了摇瓶发酵产芽孢条件优化,通过单因素及正交实验等确定了该降解菌的最佳发酵培养基。在该工作的基础上,本文在发酵罐中对该 DON 降解菌 ASAG-35 产芽孢发酵制备工艺进行研究,从而提高枯草芽孢杆菌的芽孢总量和芽孢率,并将该菌制作成直投发酵菌剂,初步应用于污染粮食中 DON 毒素的降解,为开展该菌剂的工业化生产和应用提供了数据支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验菌种与培养基

降解 DON 枯草芽孢杆菌 ASAG-35 由本实验室提供。

活化培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L,琼脂 2 g/L。

种子培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。

发酵培养基:小麦麸皮 5 g/L,玉米粉 3 g/L,氯化钠 5 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,磷酸氢二钾 1.5 g/L,硫酸锰 0.2 g/L,发酵培养基配方通过优化获得<sup>[16]</sup>。

补料培养基:糖蜜 2~20 g/L。

菌落计数培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L,琼脂 2 g/L。

单物料培养基:玉米、小麦加工副产物物料 150 g,物料通过外加 DON 毒素,将 DON 含量设置为(3 000±50) μg/kg,加水定容到 1 L,调节 pH 到 6.5,121 °C 灭菌 20 min。玉米或小麦副产物液态物料直接使用,调节 pH 到 6.5,121 °C 灭菌 20 min。

复合物料培养基:复合物料(玉米皮:蛋白粉:玉米胚:玉米稀浆=2:5:3:1) 150 g,物

料通过外加 DON 毒素,将 DON 含量设置为(3 000±50) μg/kg,加水定容到 1 L,调节 pH 到 6.5,121 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 主要仪器与设备

BLBIO-5GJG-4-H 型发酵罐:上海百仑生物科技有限公司;SW-CJ-2F 型无菌工作台:苏州安泰空气技术有限公司;PYL-125 型培养箱:天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;EVOLUTION-300 型紫外-可见分光光度计:美国 THERMO FISHER SCIENTIFIC;Waters e2695 高效液相色谱:美国 WATERS;YC-015 小型喷雾干燥机:上海雅程仪器设备有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 菌种的活化与种子液的制备

将保藏于-80 °C 冰箱的枯草芽孢杆菌菌种取出,室温解冻后在活化培养皿上进行三区划线复苏,37 °C 培养 16 h。将复苏的枯草芽孢杆菌单菌落转划到新的活化培养基皿上,37 °C 培养 12 h 后挑取单菌落接到种子培养基中,37 °C,220 r/min 培养 16 h,获得种子液。

### 1.3.2 5 L 自动发酵罐培养

5 L 发酵罐按照 70% 的体积比装液,调节 pH 到 7.0,将培养好的种子液以 10%(v/v) 的量接入 5 L 发酵罐,初始发酵条件为温度 37 °C,风量 0.2 vvm,转速  $r \geq 300$  r/min,溶氧  $DO \geq 30\%$ ,培养 26 h。

### 1.3.3 影响产菌株生长及产芽孢的实验设计

在初始发酵条件基础上,设置不同的发酵温度 30、33、35、37、39 °C,研究温度对菌株生长及产芽孢的影响;设置不同的发酵 pH 值:6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,研究 pH 值对菌株生长及产芽孢的影响;将葡萄糖、蔗糖、糖蜜、淀粉、糊精、果糖、麦芽糖等作为补料碳源,研究其对菌株生长及产芽孢的影响;设置不同补料碳源浓度,研究其对菌株生长及产芽孢的影响;选择最佳发酵温度、pH 以及补料碳源浓度,确定最适发酵时间。

### 1.3.4 发酵菌液浓度的测定

取发酵液,充分混匀后静置 10 min,取上层无颗粒杂质的发酵液 1 000 r/min 离心 20 s 后取上层发酵液,在分光光度计波长 600 nm 下测定发酵

液的吸光度。

### 1.3.5 直投菌剂制作方法

将发酵液 pH 调节为 3.5,向其中加入 20% (w/v) 膨润土后充分搅拌,喷雾干燥机进风温度 160 °C,出风温度 70 °C,风速 30 m<sup>3</sup>/h,以进料量 10 mL/min 进行喷雾干燥。

### 1.3.6 活菌数和芽孢数测定方法

活菌数计数方法参照周德庆<sup>[17]</sup>的《微生物实验手册》中的方法。芽孢总数计数方法<sup>[18]</sup>:芽孢平板计数是在 80 °C 水浴加热 20 min 后用平板菌落计数法检测芽孢的形成量,芽孢率计算公式如下:芽孢率% = 芽孢数 / 活菌数 × 100%。

### 1.3.7 DON 测定方法

DON 含量测定方法参照国标法 GB5009.111—2016<sup>[19]</sup>,高效液相色谱条件如下,色谱柱: C18 (259 mm × 4.6 mm, 5 μm, xbridge); 流动相: 水/甲醇=80/20 (v/v); 流速 0.8 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 50 μL; 检测波长: 218 nm。DON 降解率 (%) = 降解后培养基中 DON 含量 / 原培养基中 DON 含量 × 100%。

### 1.3.8 数据分析

实验重复 3 次,采用 SPSS21.0 软件对实验数据进行统计学分析,两组数据的比较采用独立样品 T 检验进行分析,显著性水平设定为 0.05; 3 组数据间的比较采用单因素方差分析的 Duncan's 法进行两两比较分析,显著性水平分析同样设定 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵温度对菌体生长和产芽孢的影响

不同温度对枯草芽孢杆菌生长有着不同的影响,5 L 发酵罐接种 10%,调节风量 0.2 vvm,转速  $r \geq 300$  r/min,溶氧  $DO \geq 30\%$ ,温度分别设定 30、33、35、37、39 °C 进行发酵,枯草芽孢杆菌发酵生长曲线见图 1,发酵结束后活菌数和芽孢数见图 2。

由图 1 可见,当发酵温度低于 37 °C 时,菌体浓度处于较低水平,当发酵温度为 37 °C 和 39 °C 时,菌体生长状况较好。值得关注的是在发酵对

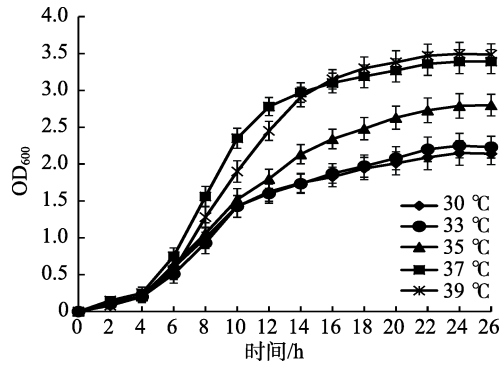


图 1 不同温度对菌体生长的影响

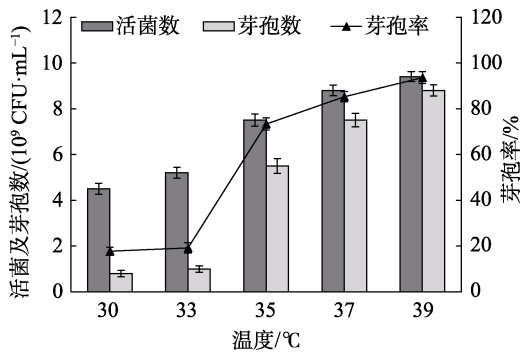


图 2 不同温度对菌体产芽孢的影响

数期, 温度 37 °C 时的菌体浓度高于 39 °C 的菌体浓度, 而在发酵进入稳定期后, 温度 39 °C 的菌体浓度高于发酵温度 37 °C 的菌体浓度。由图 2 可见, 随着温度的增加, 发酵液中的活菌数和芽孢数以及芽孢率均呈增长趋势, 39 °C 的芽孢率为 93.6%, 显著高于 37 °C 芽孢率 ( $P < 0.05$ )。由此可见, 37 °C 更有利于发酵对数期菌体的生长, 39 °C 更有利于发酵平稳期芽孢的形成。

## 2.2 发酵 pH 对菌体生长和产芽孢的影响

不同 pH 对枯草芽孢杆菌生长有不同影响, 5 L 发酵罐接种 10%, 调节风量 0.2 vvm, 转速  $r \geq 300$  r/min, 溶氧  $DO \geq 30\%$ , 温度 37 °C, pH 分别设置为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 进行发酵, 枯草芽孢杆菌发酵生长曲线见图 3, 发酵结束后活菌数和芽孢数见图 4。

由图 3 可见, 当 pH 为 6.0 和 8.0, 枯草芽孢杆菌的浓度均处于较低水平, pH 为 7.0 时, 枯草芽孢杆菌的生长状况最好, 菌体浓度  $OD_{600}$  可以达到 3.5。由图 4 可见, pH 为 7.5 时, 菌体数量虽然低于 pH 7.0 的菌体数量, 但是芽孢数量和芽

孢率均高于 pH 7.0 的芽孢率。由此可见, pH 7.0 虽然有利于枯草芽孢杆菌的生长, 但是不利于芽孢的生成, 而将 pH 设置为 7.5, 可以很好的将菌体转化为芽孢, 提高芽孢生成率。

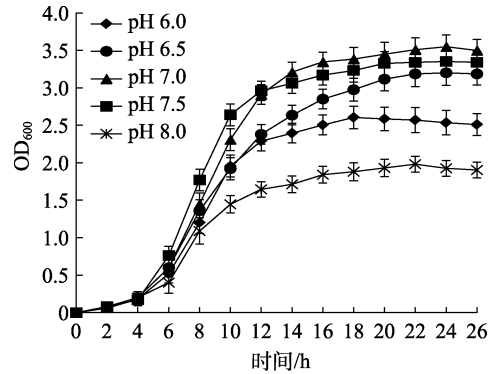


图 3 不同 pH 对菌体生长的影响

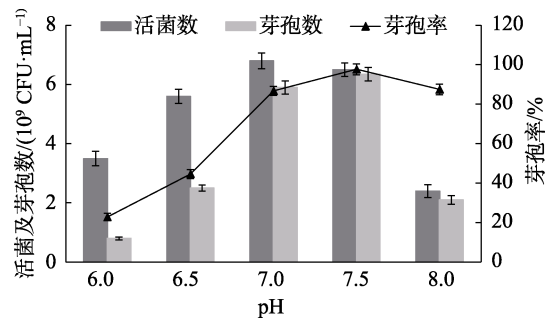


图 4 不同 pH 对菌体产芽孢的影响

## 2.3 补料碳源对菌体生长和产芽孢的影响

以发酵培养基作为对照, 以添加 2% 不同碳源的发酵培养基作为实验组, 进行枯草芽孢杆菌摇瓶发酵。以 5% 的接种量接到 250 mL 摇瓶中 (装液 50 mL), 在转速 220 r/min、温度 37 °C、pH 自然条件下培养 24 h 后检测菌体生长和产芽孢能力, 结果见图 5。

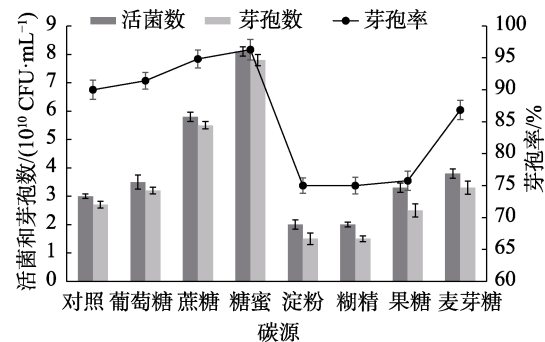


图 5 碳源对枯草芽孢杆菌生长的影响

由图 5 可见, 发酵结束后对照组活菌数为  $3 \times 10^9$  CFU/mL, 当添加葡萄糖、果糖、淀粉和糊精作为碳源时, 枯草芽孢杆菌的活菌数无显著变化 ( $P > 0.05$ ) 或有所降低, 说明该枯草芽孢杆菌不能有效利用这些碳源, 而添加蔗糖、糖蜜和麦芽糖作为碳源, 均可以显著提高 ( $P < 0.05$ ) 枯草芽孢杆菌的活菌数, 而糖蜜效果显著性最强, 总活菌数和芽孢数分别为  $8.1 \times 10^9$  CFU/mL 和  $7.8 \times 10^9$  CFU/mL, 芽孢率为 96.3%, 所以应将糖蜜作为补料碳源, 以提高枯草芽孢杆菌发酵的总活菌数和芽孢产率。

将枯草芽孢杆菌以 10% 的接种量接到 5 L 发酵罐中, 风量 0.2 vvm, 转速  $r \geq 300$  r/min, 溶氧  $DO \geq 30\%$ , 温度  $37^\circ\text{C}$ , pH 7.0, 发酵培养 12 h 后采用一次性补料, 分别添加 2、5、10、15 g/L 的糖蜜, 在发酵 36 h 后检测总活菌数和芽孢数, 结果见图 6。

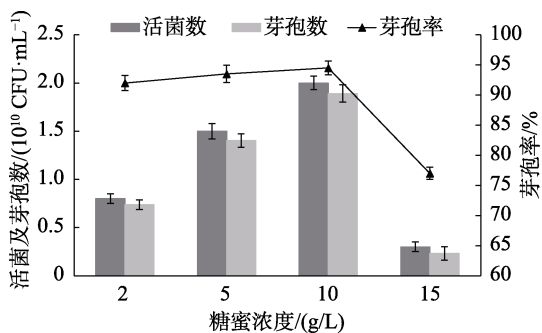


图 6 不同糖蜜添加量对菌体产芽孢的影响

由图 6 可见, 随着糖蜜添加量的增加, 活菌数和芽孢数也逐渐增加, 当一次性补加 10 g/L 糖蜜时, 发酵结束后活菌数和芽孢数均为最高, 分别为  $2.0 \times 10^{10}$  CFU/mL 和  $1.89 \times 10^{10}$  CFU/mL, 芽孢率为 94.5%, 当补加 15 g/L 糖蜜时, 活菌数和芽孢数均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 由此可见, 10 g/L 的糖蜜添加量最有利于枯草芽孢杆菌的生长和芽孢的生成。

#### 2.4 最佳发酵策略的确定

5 L 发酵罐接种 10%, 调节风量 0.2 vvm, 转速  $r \geq 300$  r/min, 溶氧  $DO \geq 30\%$ , 发酵 pH 全程控制在 7.5,  $37^\circ\text{C}$  发酵 12 h 后提高温度到  $39^\circ\text{C}$

直至发酵结束, 且在第 12 h 一次性补加 10 g/L 的糖蜜, 从第 12 h 开始, 每隔 3 h 取样, 检测活菌数和芽孢产量, 并确定最佳发酵时长, 发酵结果如图 8 所示。

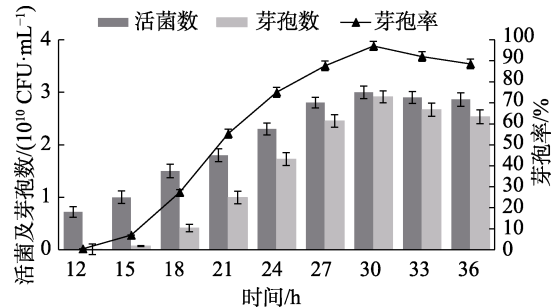


图 7 枯草芽孢杆菌在最佳发酵条件下发酵结果

由图 7 可见, 随着时间的增加, 活菌数量逐渐增加, 发酵 15 h 后, 芽孢数成对数增长, 活菌数和芽孢数持续增长到 30 h 且达到最大值, 分别为  $3.0 \times 10^{10}$  CFU/mL 和  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/mL, 芽孢率为 96.7%, 随后活菌数和芽孢率均有所下降, 说明发酵已经达到菌体生长末期, 所以应在 30 h 停止发酵。实验说明, 在发酵对数前期设置温度  $37^\circ\text{C}$  提高总活菌数, 在发酵对数中后期提高温度至  $39^\circ\text{C}$  刺激芽孢生成, 并一次性补加糖蜜, 延长枯草芽孢杆菌的生长周期, 增加活菌总量和芽孢量, 效果较好。

#### 2.5 直投菌剂在粮食加工副产物 DON 降解中的初步应用

将发酵液 pH 调节为 3.5, 向其中加入 20% (w/v) 的膨润土并充分搅拌, 喷雾干燥机进风温度  $160^\circ\text{C}$ , 出风温度  $70^\circ\text{C}$ , 风速  $30 \text{ m}^3/\text{h}$ , 以进料量 10 mL/min 进行喷雾干燥, 制成直投菌剂, 菌剂生物量  $\geq 1000$  亿/g, 含水量  $\leq 5\%$ 。

##### 2.5.1 直投菌剂降解不同粮食加工副产物中的 DON

直投菌剂以 0.2% (w/v) 的接种量接到物料培养基中,  $30^\circ\text{C}$ , 220 r/min 条件下发酵培养 15 h, 取样烘干测定物料中 DON 含量, 降解效果如图 8 所示, 该直投菌剂在玉米稀浆和复合物料中的降解效果较好, 降解率均在 90% 以上, DON 残留量在  $500 \mu\text{g}/\text{kg}$  以下; 在小麦麸皮、玉米皮、玉米蛋白粉和玉米胚芽中的降解效果相对减弱, 但降解

率也在 50% 以上, 其原因可能是物料中的营养成分以单一碳源或氮源为主, 菌体生长状态没有复合物料生长状态好; 而降解菌在玉米浓浆中的降解效果较差, DON 降解率低于 10%, 分析其原因可能是在玉米浆中无机盐含量较高, 不利于该芽孢杆菌的生长。该菌在粮食加工副产物 DON 发酵降解的应用中效果较好, 具有较广泛的应用前景。

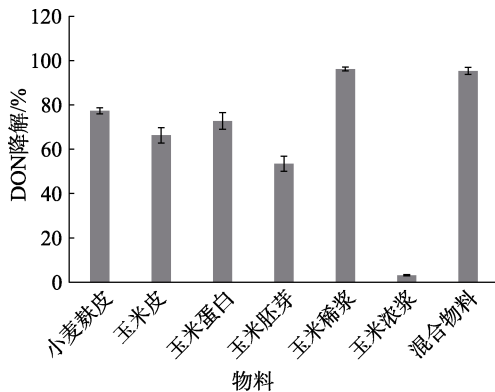


图 8 直投菌剂降解不同物料中的 DON

### 2.5.2 直投菌剂接种量对粮食加工副产物 DON 降解的影响

分别将直投菌剂以 0.01%、0.1%、0.5%、1% 的接种量接到复合物料培养基中, 37 °C, 220 r/min 条件下培养 15 h, 取样烘干测定物料中 DON 含量, DON 降解率如图 9 所示, 随着直投菌剂接种量的增加, DON 的降解率也随之增加, 当菌剂接种量为 0.01%, DON 的降解率为 62.2%, 当添加量为 0.1% 时, 降解率为 92.7%, 添加 0.5% 和 1% 时, DON 降解率分别为 96.3% 和 98.8%。接种量在 0.1% 以上时, DON 降解率均达到 90% 以上, DON 残留量在 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下, 说明 0.1% 以上的菌剂接种量可以较好地降解物料中的 DON。

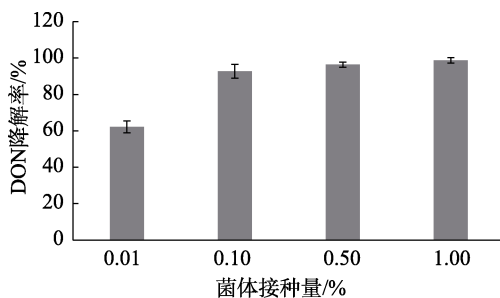


图 9 直投菌接种量对物料中的 DON 降解的影响

### 2.5.3 物料培养基中不同干物质含量对菌剂降解粮食加工副产物 DON 的影响

分别将直投菌剂以 0.1% 接种量接到不同干物质含量的复合物料培养基中, 置于 30 °C, 220 r/min 条件下发酵 15 h, 取样烘干测定物料中 DON 含量, 结果如图 10 所示, 当物料培养基干物质含量在 20% 以下时, DON 降解效果较好, 降解率均在 90% 以上, DON 残留量在 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下, 当干物质含量为 30% 时, 降解率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 降解率为 55.1%, 并且随着物料培养基中干物含量的增加, 降解率随之下降, 分析其原因, 物料培养基中干物含量高, 导致溶氧不足, 降解菌只能在初期生长后便无法继续增殖, 从而无法有效地降解物料中的 DON。由此可见, 物料培养基中水分含量高, 更有利于降解菌发挥作用。

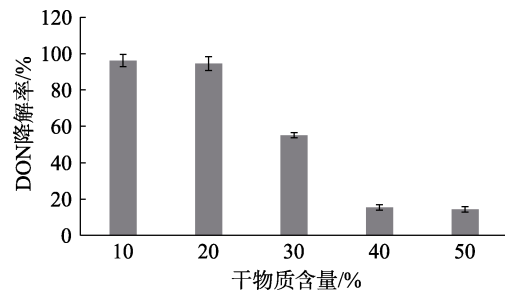


图 10 不同干物质含量的物料培养基对直投菌剂降解 DON 的影响

## 3 讨论

孙梅、宋卡魏等<sup>[20-21]</sup>的研究中表明高溶氧有利于枯草芽孢杆菌的生长和芽孢的生成, 所以在本研究中, 将溶氧控制在 30% 以上, 而以发酵温度、pH、补料碳源及补料量等作为优化条件研究其对枯草芽孢杆菌产芽孢的影响。在郭夏利、王法富等<sup>[11-12]</sup>的研究中, 主要研究摇瓶中初始 pH 对枯草芽孢杆菌产芽孢的影响, 未对整体发酵的 pH 进行监控, 而本研究结果表明, 当全程 pH 控制在 7.5, 更有利于芽孢的生成, 提高芽孢产率。通过分阶段控温发酵, 即在发酵前 12 h 的对数期将温度控制在 37 °C, 利于菌体生长, 而 12 h 后将温度调高到 39 °C, 更有利于枯草芽孢杆菌生成芽孢, 这与文献报道的结果有所区别<sup>[20-21]</sup>。此

外, 在本研究中整体发酵时间均少于报道中<sup>[22-23]</sup>的发酵时间, 更加利于工业生产缩短发酵周期, 降低工业能耗。

速效碳源有利于枯草芽孢杆菌的生长<sup>[24]</sup>, 但是葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等碳源对枯草芽孢杆菌产芽孢的影响不大, 这与郭荣君等<sup>[25]</sup>的部分研究成果相一致。在本研究中, 将糖蜜作为补料碳源添加到发酵培养基中, 总活菌数和芽孢生成率均显著提高。糖蜜作为复合碳源, 其中含有丰富的生物素和矿物质, 尤其是促进细胞增长的重要物质, 这也从侧面说明了糖蜜既可以促进枯草芽孢杆菌生长又可以促进芽孢的生成。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇的存在一直危害着粮油加工、饲料生产及畜牧行业, 使这些行业蒙受着巨大的损失, 而枯草芽孢杆菌菌剂正在被这些行业广泛地应用。本研究利用发酵罐对降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇直投菌剂发酵制备工艺进行研究并获得最佳发酵策略, 增加了芽孢生产率, 并且将该菌剂初步应用于污染粮食加工副产物中 DON 的脱除, 效果显著, 减少真菌毒素给这些行业带来的困扰。

#### 参考文献:

- [1] PAPADOPOULOU-BOURAOUI A, VRABCHEVA T, VALZACCHIS, et al. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Food Addit Contam, 2004, 21(6): 607-617.
- [2] BULLERMAN L B, BIANCHINIA. Stability of mycotoxins during food processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 119(1-2): 140-146.
- [3] 任永军, 邝良德, 雷岷, 等. 呕吐毒素对母兔繁殖性能的影响[J]. 中国养兔, 2019, 2: 8-10.
- [4] 伍力, 吴飞, 黎俊, 等. 呕吐毒素对母猪影响研究进展[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(8): 83-85.
- [5] PESTKA J J, SMOLINSKI A T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2015, 8(1): 39-69.
- [6] 程亮, 伍松陵, 沈晗, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解菌的筛选与鉴定[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(5): 95-97.
- [7] 徐剑宏, 祭芳, 王宏杰, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解菌的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4635-4641.
- [8] 李晓凤, 刘思力, 谭景耀, 等. 生物降解呕吐毒素的肠杆菌筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6): 125-132.
- [9] 谭剑, 杨硕, 苏会波, 等. 一株降解呕吐毒素枯草芽孢杆菌的鉴定与降解效果研究[J]. 当代化工, 2018, 47(3): 548-551.
- [10] DELPHINE D, KASSEM H, VINCENTG, et al. In situ localization and quantification of surfactin in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry[J]. Microbiology, 2008, (8): 3682-691.
- [11] 郭夏丽, 狄源宁, 王岩. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化[J]. 中国土壤与肥料, 2012(3): 99-103.
- [12] 王法富, 刘孟涵, 刘利利. 枯草芽孢杆菌出芽培养条件优化[J]. 当代化工, 2018, 47(2): 286-289.
- [13] 曹丁, 黄乐天, 李学优, 等. 产抗菌肽芽孢杆菌的制剂制备及其对仔猪生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2018, 5: 20-24.
- [14] 刘年浪, 焦图强, 张剑, 等. 枯草芽孢杆菌菌剂在黄瓜枯萎病防治上的应用初报[J]. 湖南农业科学, 2006(8): 81-83.
- [15] 肖伟, 闫培生. 1 株生防枯草芽孢杆菌作为活体菌剂在小麦种子贮藏中的应用研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 195-200.
- [16] 刘虎军, 常晓娇, 王楠希, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌 ASAGW-10 产芽孢条件研究[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(4): 50-54.
- [17] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 30-31, 81-83.
- [18] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 104.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫局. 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定: GB5009. 111—2016[S].
- [20] 孙梅, 匡群, 施大林, 等. 培养条件对纳豆芽孢杆菌芽孢形成的影响[J]. 生物技术, 2006, 27(8): 19-24.
- [21] 宋卡魏, 王星云, 张荣意. 培养条件对枯草芽孢杆菌 B68 芽孢产量的影响[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 25-29.
- [22] 刘宽博, 谢远红, 熊利霞, 等. 一株抗单增李斯特菌细菌素的枯草芽孢杆菌 C3 产芽孢条件的优化[J]. 饲料研究, 2016, 7: 45-53.
- [23] 王西祥, 丁延芹, 杜秉海. 响应面法优化枯草芽孢杆菌 NS178 产芽孢发酵工艺[J]. 山东农业科学, 2015, 47(4): 59-65.
- [24] MOHAMED ISMAIL A K. The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(1): 34-43.
- [25] 郭荣君, 王步云, 李世东. 营养对生防菌株 BH1 芽孢产量的影响研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 283-285