

## 生物转化玉米浆生产生物菌肥的共生发酵特性

任晓洁<sup>1,2</sup>, 班恒<sup>1</sup>, 贺壮壮<sup>1</sup>, 王晓龙<sup>3</sup>, 赵玉斌<sup>4</sup>, 宋元达<sup>1</sup>, 赵新河<sup>1,4,5\*</sup>

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院考林腊特列杰微生物脂质国际研究中心, 淄博 255000;

2. 山东福洋生物科技股份有限公司, 德州 253000; 3. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京 100015;

4. 鲁洲生物科技有限公司, 临沂 276400; 5. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 青岛 266237)

**摘要:**玉米深加工是全球第二大宗农产品加工行业, 玉米淀粉制备过程中产生大量的副产物, 如玉米浆(Maize Steep Liquor, MSL)。玉米浆色深味重、毒素含量高、处理困难, 已经成为众多玉米深加工企业发展的桎梏。该研究主要利用玉米浆中丰富的速效氮源和微生物的促生长因子进行微生物菌肥的开发。通过对前期筛选到的3株植物根际促生菌(PGPMs)的共生发酵研究, 评估了3种菌在玉米浆中高密度发酵的可行性, 并对发酵特性进行了研究。试验结果表明, 3种菌通过共生发酵, 并在模拟流加工业废料结晶糖母液作为补料时, 发酵体系中的总生物量从 $6.6 \times 10^9$ 提升到了 $2.17 \times 10^{10}$  CFU/mL, 并在52 h氨基酸态氮含量达到最大。同时, 采用葡萄糖模拟结晶糖母液流加补料显著提高了共生体系的总糖以及溶磷的利用率, 可溶性磷利用率提高了近50%; 此外, 添加葡萄糖还能保持发酵体系的pH值稳定, 奠定了生产稳定性。该研究为玉米浆的再利用提供了一种解决方法, 对低成本生物肥料的开发与生产提供了一种新的思路。

**关键词:** 菌; 发酵; 玉米浆; 生物菌肥; 根际促生菌; 微生态

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.17.022

中图分类号: S-3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2022)-17-0205-08

任晓洁, 班恒, 贺壮壮, 等. 生物转化玉米浆生产生物菌肥的共生发酵特性[J]. 农业工程学报, 2022, 38(17): 205-213.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.17.022 <http://www.tcsae.org>

Ren Xiaojie, Ban Heng, He Zhuangzhuang, et al. Symbiotic fermentation characteristics of biotransformed maize pulp for biofertilizer production[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(17): 205-213. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.17.022 <http://www.tcsae.org>

## 0 引言

玉米淀粉是目前生产葡萄糖浆和各种糖类衍生物的主要资源<sup>[1]</sup>。玉米深加工通过浸泡、粉碎、筛分、干燥、浓缩、洗涤、萃取等工艺, 得到大量的玉米淀粉, 此外还产生了粗纤维饲料、玉米蛋白粉、玉米浆等大宗副产品<sup>[2]</sup>。而玉米浆(Maize Steep Liquor, MSL)是玉米淀粉湿磨加工过程中经过亚硫酸浸泡后产生的废水浓缩而成的一类高浓度有机废水<sup>[3]</sup>。它含有丰富的蛋白质、氨基酸和促生长因子等营养物质<sup>[4]</sup>, 常作为饲料等营养补充剂以及发酵工业廉价氮源<sup>[3-6]</sup>。但因其高氨氮、高化学需氧量、高酸度的特性, 限制了其广泛应用。生物菌肥是利用微生物学原理, 用特定功能微生物在适合的载体上经过发酵而成, 含有大量的有益微生物以及其他活性物质, 能够促进植物生长的一类活菌制剂<sup>[7]</sup>。玉米浆中丰富的速效氮源和促生长因子可以提高微生物细胞量生长<sup>[8]</sup>。

然而玉米浆是一种复杂的多相体系, 由多种可溶性物质和低溶解度的固相(如不溶性磷酸钙镁盐等)组成, 并且玉米浆中毒素含量颇高, 其中黄曲霉毒素、玉米赤

霉烯酮、呕吐毒素是玉米浆中主要毒素成分, 是玉米浆质量的关键控制点<sup>[9]</sup>。多数研究把少量玉米浆作为促生长因子和廉价氮源添加到发酵介质中, 过量的玉米浆添加会导致发酵培养基氮的过量, 对产物的合成造成不良影响<sup>[10]</sup>。到目前为止, 在玉米浆中这一多相体系的发酵特征在实际生物利用过程中被忽视。微生物肥料作为一种有益的土壤修复和营养补充物, 在生态农业中扮演重要的角色。例如, Xu等<sup>[11-14]</sup>分别将甘薯淀粉废水、木薯废料和味精副产物转化为生物肥料。因此, 利用玉米浆开发生物菌肥, 不仅能够利用土壤以及微生物对毒素的缓释和降解作用, 解决玉米浆的难利用问题, 还可以降低菌肥生产成本, 提高附加值。

除了培养基原料外, 菌种也是决定生物发酵及产品好坏的关键因素, 不同菌种其发酵特性差异极大。在已有的生物肥料的报道中大部分菌肥都是针对于一种植物或者农作物的生长影响, 整体来说缺乏适用性, 研究意义比较局限。本研究最终筛选了枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和黑曲霉为目标菌株。Kayasth等<sup>[15-16]</sup>鉴定地衣芽孢杆菌是开发多功能生物肥料的理想菌株, 它能产生吲哚乙酸(Indole Acetic Acid, IAA)、铁螯合剂、溶解磷酸盐, 并具有促进植物生长的特性。大量研究证实枯草芽孢杆菌在IAA生产、生物防治、土壤恢复等方面促进植物生长<sup>[17-19]</sup>。此外, 由于目前国内外施用无机肥料还是种植农作物的主要施肥方式, 不仅增加了成本, 还导致土壤酸化、压实、地下水污染等对环境的负面影响<sup>[20]</sup>,

收稿日期: 2022-06-01 修订日期: 2022-08-30

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2020MC201); 中国博士后基金项目(2019M662362); 促进与加拿大、澳大利亚、新西兰及拉美地区科研合作与高层次人才培养项目(2022-1007美洲留学基金)

作者简介: 任晓洁, 博士, 讲师, 研究方向为发酵工程。

Email: renxiaojie2020@163.com

\*通信作者: 赵新河, 博士, 副教授, 研究方向为发酵工程。

Email: zhaoxinhe@sdu.edu.cn

另一方面,当前生物肥料的研究并不成熟,所以研发一种适用性广且使用有益微生物和有机垃圾组成的的低成本生物肥料对现代社会来说仍然是一个迫切的挑战。

所以本研究以玉米浆为主要原料,通过共生发酵技术探究枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、黑曲霉在玉米浆中共生发酵过程,同时以葡萄糖模拟淀粉厂废液——结晶糖母液<sup>[21]</sup>,模拟评估 3 菌种在流加结晶糖母液的玉米浆中高密度发酵时细胞生长及发酵特性,为进一步高蛋白质类废弃物——玉米浆的利用拓宽市场,为玉米淀粉加工企业废弃物的高附加值再利用提供了参考;为以多种细菌为基础开发实用型菌肥奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

前期工作从生物菌肥工业生产菌种中筛选到了 9 株功能性菌株,分别在解磷和产酸、降解大分子含氮物等方面效果显著,且经过共生发酵菌群组合研究筛选得到 3 株没有拮抗作用且能相互促进的菌种,分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 3301)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* F18)和黑曲霉(*Aspergillus niger* 3324),由山东理工大学食品科学与工程综合实验室保藏。

### 1.2 试验材料

玉米浆(MSL)由鲁洲生物科技有限公司提供。在经过一系列测定可得MSL的pH值以及各类营养物质的质量比;pH值为(4.3±0.1),蛋白质含量可达17.2%(干基蛋白质51.1%),总糖含量为4.52%±0.1%(质量比),灰分含量达到7.46%,含水量为67.14%,波美度浓度为21°Bé。

由于玉米浆中含有丰富的蛋白质、氨基酸等氮元素,其蛋白质质量分数可达17.2%,因此,常作为发酵工业的优质氮源。然而玉米浆中的碳源含量相对较低,总糖质量分数只有4.52%±0.1%,因此为了保证微生物生长所需的碳氮平衡,对比了玉米浆中补充适量碳源是否有利于供试菌株生长。本试验选取了葡萄糖(40 g/L)作为补料,用其来模拟玉米淀粉厂的废液(结晶葡萄糖母液)<sup>[21]</sup>。

种子培养基:牛肉膏蛋白胨(Nutrient Broth)培养基<sup>[22]</sup>,pH值为7;改良马丁培养基<sup>[23]</sup>,pH值为6.2~6.6。

细菌计数培养基:牛肉膏蛋白胨(Nutrient Broth)培养基(用于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌计数),pH值为7;真菌计数培养基:孟加拉红培养基<sup>[24]</sup>(Rose Bengal Medium)(用于黑曲霉计数),pH值为7。均使用稀释平板法进行计数。

摇瓶培养发酵培养基:200 g/L玉米浆;发酵罐分批培养发酵培养基:前期试验200 g/L玉米浆在发酵罐中产生大量泡沫影响发酵过程,因此选用100 g/L玉米浆;采用氢氧化钾作为pH中和剂调节初始pH值为6.5,121℃灭菌20 min。

### 1.3 种子培养

分别从斜面菌种刮取2环菌落接种至种子培养基中,枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌接种至牛肉膏蛋白胨(NB)培养基,37℃,160 r/min,摇瓶培养18~20 h;黑曲霉接种至改良马丁培养基,30℃,160 r/min,摇瓶培养24 h。

### 1.4 发酵培养

摇瓶培养:摇瓶培养发酵培养基,分装于250 mL三角瓶,每瓶装液量50 mL,将3种菌株种子液按照10%接种量接入发酵培养基中,另外在对照组中添加葡萄糖(40 g/L),分别于30℃,160 r/min,摇床培养72 h。

5 L发酵罐(5 L全自动发酵罐,迪必尔生物工程有限公司)分批培养:配制分批培养发酵培养基,按5%接种量将黑曲霉种子液接入5 L发酵罐中;初始通气量2 L/L·min;搅拌转速300 r/min;通过自动流加2 M氢氧化钾和硫酸控制pH值为6.5;培养温度30℃;培养24 h后,分别以质量分数5%的接种量接入枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌种子液,调整通气量为4 L/(L·min),流加氢氧化钾调节pH值为7,培养温度为37℃。

葡萄糖流加方式:发酵24 h后,将浓度为40%的葡萄糖按照10 mL/h的流加速度补入;流加周期24 h。

### 1.5 分析方法

有效活菌数采用稀释平板法测定;氨基酸态氮按照国标GB/T 5009.235-2016甲醛滴定法测定;溶磷采用钼蓝分光光度法测定;溶氧、酸碱流加量测定采用发酵罐系统在线测定;葡萄糖浓度和谷氨酸浓度采用生物传感仪测定(SBA-40C,山东省科学院生物研究所)。

流变特性分析使用配备有一对同轴圆柱体的Kinexus Lab+旋转流变仪(英国Malvern仪器)测定,内径和外径分别为25和27.5 mm,在25℃下以0.1~50 s<sup>-1</sup>的剪切速率在线性黏弹性区中评估黏度。黏弹性数据由Ostwald de Waale模型拟合

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

式中 $\eta$ 为表观黏度,Pa·s; $\dot{\gamma}$ 为剪切速率,s<sup>-1</sup>;K是一致性指数,n是提供有关受剪切速率影响的流动行为信息的指数。

在25℃下从0.1~10 Hz进行频率扫描。测量了储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )之间的关系。

发酵特性计算式如下:

$$\Delta AAN = C_N - C_{N0} \quad (2)$$

$$\Delta P = C_P - C_{P0} \quad (3)$$

$$\Delta T.S = C_T - C_{T0} \quad (4)$$

$$\Delta R.S = C_R - C_{R0} \quad (5)$$

式中 $C_T$ 为发酵液中总糖含量, $C_P$ 为发酵液中可溶性磷含量, $C_N$ 为发酵液中氨基酸氮(AAN)含量, $C_R$ 为发酵液中还原糖含量, $C_{P0}$ 、 $C_{N0}$ 、 $C_{T0}$ 、 $C_{R0}$ 分别代表未接种微生物时MSL培养基的初始磷、氮、总糖、还原糖含量, $\Delta T.S$ , $\Delta R.S$ 为总糖和还原糖消耗量,单位均为mg/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 3种功能菌种在玉米浆中纯培养的发酵特性

首先分别对这3株菌在玉米浆中纯培养的特性进行了研究和优化。之后试验分别将供试菌株(枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、黑曲霉)接种在有无添加葡萄糖的玉米浆培养基中,各菌株的发酵特性如表1所示。

在纯玉米浆培养基中发酵72 h后,3株菌分别达到了最高活菌数,其中枯草芽孢杆菌的活菌数最高,达

$3.05\times10^9$  CFU/mL，地衣芽孢杆菌活菌数达到  $1.8\times10^9$  CFU/mL，黑曲霉活菌数为  $3.5\times10^6$  CFU/mL。在以 40 g/L 葡萄糖流加补料后，枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌活菌数均升高，尤其是地衣芽孢杆菌活菌数提升明显，最高达到  $1.79\times10^{10}$  CFU/mL。添加葡萄糖作为补料明显促进了枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的细胞量。相反地，黑曲霉的活菌数变化量不大，说明添加葡萄糖可

以有效提高整个体系内的细胞数量。

表 1 中数据可得 3 种菌株对玉米浆中碳源的消耗情况。可以看出虽然 3 菌株单独培养时，对玉米浆中总糖的利用率都不足 60%，但是黑曲霉对玉米浆中糖源的利用率明显高于其他菌株。

图 1a 为活菌数分析，3 种细菌在 MSL 培养基均有增长，表明生长态势较好。

表 1 葡萄糖对菌体在玉米浆中发酵特性							
Table 1 Fermentation characteristics of glucose on the bacterium in maize pulp							
菌株 Bacterial species	培养基种类 Culture medium type	生物量 Biomass/( $10^8$ CFU·mL <sup>-1</sup> )	ΔAAN/(mg·L <sup>-1</sup> )	ΔP/(mg·L <sup>-1</sup> )	ΔT.S/%	pH 值 pH value	ΔR.S/%
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> 3301	玉米浆	34.0±1.9	531.3±61.6	-669.8±7.7	35.2±2.6	7.34±0.01	57.9±2.1
	玉米浆流加葡萄糖	38.5±2.5	267.5±43.5	-458.7±3.1	90.5±0.2	7.18±0.04	80.09±0.2
地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i> F18	玉米浆	32.0±0.7	600.1±143.1	-494.2±3.1	30.3±3.2	7.08±0.03	51.5±6.2
	玉米浆流加葡萄糖	179.0±0.2	383.6±28.8	-154.3±4.8	83.0±0.5	6.86±0.01	76.7±0.8
黑曲霉 <i>A. niger</i> 3324	玉米浆	11.5±0.7(×10 <sup>6</sup> )	510.1±34.0	-136.1±41.9	37.6±5.4	6.18±0.03	70.5±1.2
	玉米浆流加葡萄糖	12±2.5(×10 <sup>6</sup> )	143.4±46.9	63.5±10.9	85.0±0.4	5.06±0.03	87.1±0.4

注：ΔAAN 为氨基酸态氮变化量；ΔP 为可溶性磷消耗量，%；ΔT.S 为总糖消耗量，%；pH；ΔR.S 为还原糖消耗量，%；±代表标准差，下同。  
Note: ΔAAN is change of amino acid nitrogen; ΔP is phosphorus change, %; ΔT.S is total sugar consumption, %; pH is pH value; ΔR. S is consumption of reducing sugar, %; ±, The standard deviation, the same below.

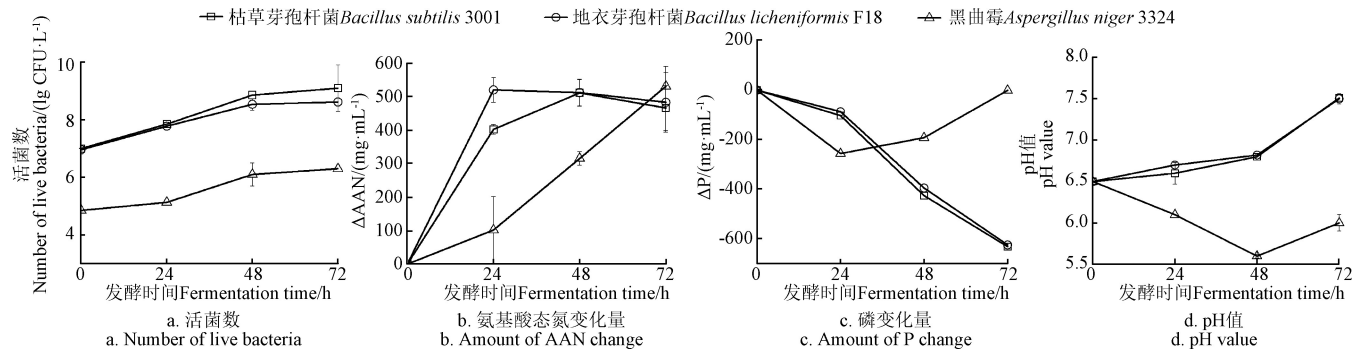


图 1 三种细菌在 MSL 培养基中培养的活菌数，氨基酸态氮变化量（ΔAAN），磷变化量（ΔP）和 pH 值情况的变化  
Fig.1 Variation of viable count, amino acid nitrogen change (ΔAAN), phosphorus change (ΔP), and pH value of the three strains cultured in MSL medium

图 1b 显示 3 菌株均可提高玉米浆中游离氨基酸态氮的含量，可将玉米浆中蛋白质分解为游离氨基酸。尤其是地衣芽孢杆菌的氨基酸态氮含量增加量最高，达到 600 mg/L。但是根据表 1 中的数据可得，添加葡萄糖后 3 菌株的氨基酸态氮含量明显降低，该情况可能是葡萄糖的添加使微生物生长速度加快，细胞量的增加加速了玉米浆中氨基酸态氮的消耗，从而降低了氨基酸态氮的含量；并且随着发酵的进行，氨基酸也会参与到一些生理生化反应中，所以氨基酸总量会不断减少。

玉米浆中不仅含有丰富的蛋白质资源，同时含有丰富的磷元素。玉米浆中磷以植酸的形式存在，植酸可与玉米浆中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、蛋白质等螯合形成不溶性盐，影响微生物对营养物质的利用<sup>[25]</sup>。图 1c 表示了 3 菌株对玉米浆中溶磷的利用情况，枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌能够有效利用玉米浆中的有机磷用于自身细胞生长，尤其是地衣芽孢杆菌发酵玉米浆后溶磷含量降低最多。另外，只有黑曲霉的可溶性磷含量在添加葡萄糖后呈现正效应，说明葡萄糖的添加可以提高黑曲霉对玉米浆中部分不溶性有机磷转化为溶磷的转化率。

图 1d 看出黑曲霉发酵液的 pH 值明显低于其他菌株。同时，添加葡萄糖后各菌株发酵液 pH 值明显降低，尤其是黑曲霉降低最明显，最低 pH 值可达到 5.5。发酵液 pH 值与可溶性磷含量基本呈现负相关。说明添加葡萄糖后，黑曲霉产生较多的有机酸，降低发酵液 pH 值，有机酸可以促进不溶性磷酸盐的溶解。总之，枯草芽孢杆菌，地衣芽孢杆菌和黑曲霉能够较好的利用玉米浆中营养物质，玉米浆可作为 3 种菌株的营养基质。同时，添加葡萄糖后明显提高了各菌株的糖利用率，增加了各菌株的生物量，说明在玉米浆中添加葡萄糖可以进一步促进微生物的生长。该试验结果为玉米淀粉厂废液（结晶葡萄糖母液）的利用提供了思路，将玉米淀粉企业的玉米浆与结晶葡萄糖母液联合利用，可以作为微生物菌肥开发的廉价原料。

### 2.2 共生发酵过程中流加葡萄糖显著提高玉米浆菌肥活菌数

不同菌株在生长对数期存在差异，所以采用普通的接种方式会导致枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和黑曲霉共生发酵过程中活菌数较低，难以获得最大细胞数。因

此,根据 3 种菌株在玉米浆培养基中的生长曲线,采用延迟接种的方法以获得最大活菌数。在 5 L 发酵罐中分批培养,评价 3 种菌株在玉米浆多相体系中共生发酵过程

中生长变化,即先在玉米浆中接种黑曲霉培养 24 h,再接种枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,每隔 6 h 取样测定各菌株活菌数,共生发酵过程中细胞变化曲线如图 2 所示。

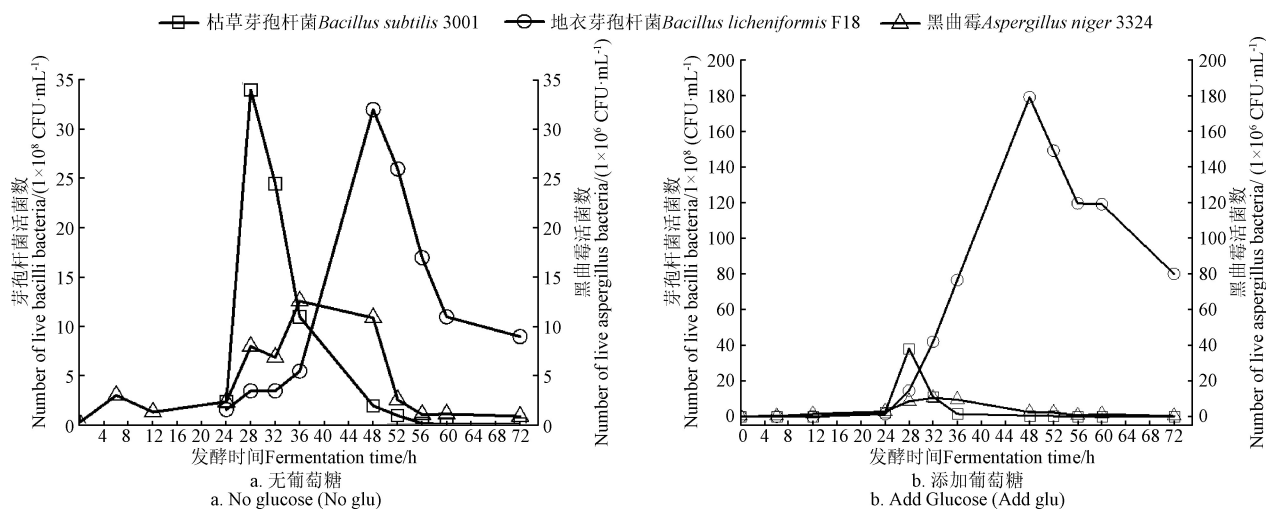


图 2 3 种菌共生发酵过程活菌数变化情况

Fig.2 Changes in the number of live bacteria during the symbiotic fermentation of three species of bacteria

图 2a 为不添加碳源的玉米浆 3 菌株细胞变化曲线,3 种菌株的细胞生长均呈现先增长后降低的趋势,枯草芽孢杆菌在 24 h 接种后开始迅速生长,在 30 h 细胞量最高为  $3.05 \times 10^9$  CFU/mL。紧接着黑曲霉在接种后 40 h 左右到达最高值,达  $1.25 \times 10^9$  CFU/mL。最后地衣芽孢杆菌细胞量在 50 h 达到最高值  $3.25 \times 10^9$  CFU/mL。

图 2b 为流加了 40% 浓度葡萄糖的 3 菌株细胞变化曲线,3 种菌株到达最高生物量的顺序与未添加葡萄糖的一致,均呈现枯草芽孢杆菌先到达生物量峰值,其次是黑曲霉,最后是地衣芽孢杆菌。但是流加葡萄糖后黑曲霉在 34 h 时细胞量达到了最高值,比未流加葡萄糖时到达细胞量峰值的时间明显提前了 (提前了 6 h)。而地衣芽孢杆菌的细胞量明显提高了,最高达到了  $1.79 \times 10^{10}$  CFU/mL,比未流加葡萄糖的情况下提高了 600%。同时黑曲霉的活菌数也增加为  $1.2 \times 10^7$  CFU/mL。说明葡萄糖的流加不仅可以提高发酵体系中的活菌数量,还能加速黑曲霉的生长。由以上数据计算得出发酵罐分批培养过程中流加葡萄糖可以显著提高发酵体系的活菌数量,在发酵过程中发酵体系中的总生物量从  $6.6 \times 10^9$  提升到了  $2.17 \times 10^{10}$  CFU/mL。

枯草芽孢杆菌和黑曲霉为好氧微生物,枯草芽孢杆菌在接种后会迅速夺取发酵基质中的溶解氧和营养物质,细胞量迅速繁殖<sup>[26]</sup>。进一步地,黑曲霉到达生长峰值,地衣芽孢杆菌为兼性厌氧微生物,枯草芽孢杆菌和黑曲霉此时到达衰亡期,没有和地衣芽孢杆菌的竞争位点,此时地衣芽孢杆菌开始迅速生长繁殖,在 50 h 达到最高值,此时玉米浆中营养物质不足导致地衣芽孢杆菌进入生长衰亡期。

### 2.3 共生发酵过程游离氨基酸态氮含量提高

玉米浆中含有丰富的蛋白质和氨基酸等氮源,接种产蛋白酶等酶系的微生物可以有效降低玉米浆中的蛋白质等大分子物质。通过测定氨基酸态氮的含量可以评价 3

种菌株对玉米浆中氮源的利用情况。图 3 表示了共生发酵过程中玉米浆氨基酸态氮和其中代表性氨基酸—谷氨酸的变化情况。可以看出,发酵前期玉米浆中氨基酸态氮含量降低,说明此时黑曲霉的生长直接利用玉米浆中氨基酸用于自身生长。没有流加葡萄糖发酵时,在 24 h 以后氨基酸态氮含量迅速增加,在 52 h 到达最高值,增加了约 900 mg/L。52 h 后氨基酸态氮含量开始降低。流加葡萄糖发酵时,氨基酸态氮含量明显低于未流加葡萄糖时的含量。这一现象与 3 菌株纯培养时一致。谷氨酸变化趋势呈现先增加后减少的趋势。0~35 h 谷氨酸含量不断增加,在 28 h 达到最高值为 450 mg/L。流加葡萄糖后,谷氨酸含量明显增加,在 35 h 时谷氨酸含量最高为 550 mg/L。前期菌株产生的蛋白酶将玉米浆中部分蛋白质分解为谷氨酸,谷氨酸含量增加,后期菌体利用了谷氨酸用于生长,导致含量降低。因此,在玉米浆接种微生物可将其中蛋白质发酵降解成植物可直接利用的氨基酸,在发酵 35 h 其谷氨酸含量最高,在 52 h 发酵物中氨基酸态氮含量最高。

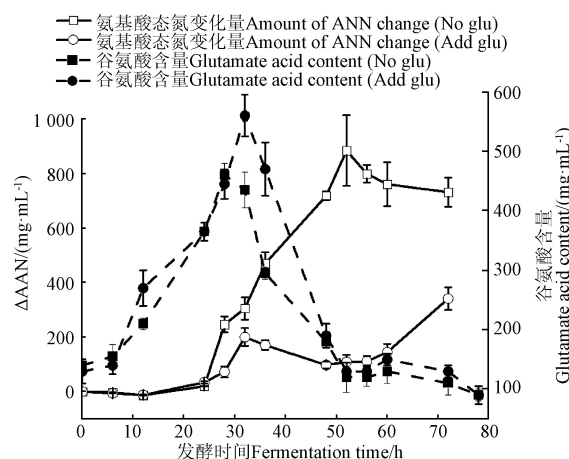


图 3 玉米浆共生发酵过程氨基酸态氮和谷氨酸变化  
Fig.3 Changes in amino acid nitrogen and glutamate during co-fermentation of maize pulp

## 2.4 共生发酵显著提高碳源和磷源利用率

玉米浆中含有丰富的溶磷, 溶磷可为微生物生长繁殖提供充足的磷源, 促进微生物生长。图 4a 是玉米浆发酵过程中溶磷动态变化。可以看出 52 h 前可溶性磷含量降低, 随后溶磷含量基本无明显变化。说明共生发酵过程中溶磷为微生物的生长繁殖提供了充足的磷源。尤其是流加葡萄糖后, 上清液中可溶性磷含量明显降低。因为流加葡萄糖后共生发酵活菌数量明显增加, 导致磷的消耗量显著增加, 在 52 h 各菌株均进入衰亡期, 消耗曲线趋于平缓。

图 4b 为玉米浆中碳源消耗曲线。可以看出葡萄糖的

消耗速率高于还原糖消耗率。0~24 h 玉米浆中可发酵糖迅速被消耗用于细胞生长, 24 h 后糖源消耗变缓, 趋于稳定。0~24 h 阶段处于黑曲霉单菌种生长阶段, 前面研究中发现黑曲霉对玉米浆中糖源的利用率可达到 70% (图 4b), 因此接种黑曲霉后玉米浆中碳源被迅速利用。24 h 流加葡萄糖后碳源消耗曲线仅略高于未流加时, 尤其是 24~32 h 碳源消耗情况基本保持一致, 此阶段为黑曲霉迅速生长, 流加的葡萄糖均被黑曲霉利用。因此玉米浆中溶磷在发酵过程中被迅速消耗, 可有利于细胞生长, 同时玉米浆中可发酵糖不足以支撑黑曲霉生长, 流加葡萄糖的同时碳源也基本被消耗, 后期可适当提高碳源流加量。

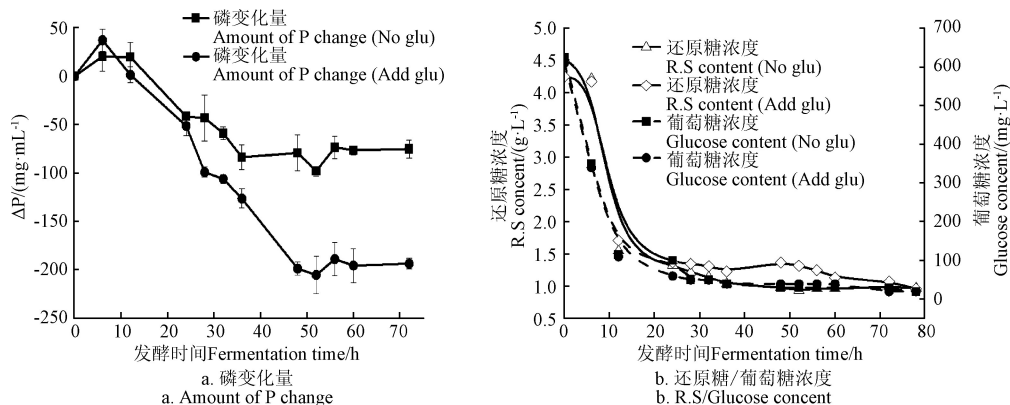


图 4 玉米浆共生发酵过程中磷及还原糖/葡萄糖变化

Fig.4 Changes in dissolved phosphorus and R.S/Glucose consumption during co-fermentation of maize pulp

## 2.5 流加葡萄糖增加了共生发酵体系的稳定性

溶氧是发酵过程中重要的控制参数之一。溶氧大小对菌体生长和产物生产有不同的影响。图 5 表示了玉米浆共生发酵过程中溶氧变化。0~12 h 发酵体系中溶氧含量迅速降低, 黑曲霉是好氧菌, 会迅速夺取发酵基质中的溶解氧用于生长代谢。24 h 接种枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌后, 将通气量从 2 L/(L·min) 调整为 4 L/(L·min), 溶氧略有增加但很快被枯草芽胞杆菌和黑曲霉利用。溶氧量不足限制了好氧微生物在玉米浆中生长, 这可能是限制玉米浆中微生物高密度生长的重要因素之一。

未流加葡萄糖时 24~48 h 阶段溶氧量高于流加葡萄糖时溶氧。因为补糖后, 摄氧率就会增加, 引起溶氧浓度的下降, 经过一段时间以后又逐步回升。在发酵过程中, 一旦葡萄糖耗尽, 生产菌的比摄糖速率降低, 比耗氧速率也随之降低, DO 值逐渐回升; 当比摄糖速率低于临界值时, 流加补入葡萄糖后使生产菌的比摄糖速率增加, 比耗糖速率升高, DO 值降低。另外发酵系统跟踪测定了发酵过程中补料调节 pH 值过程中酸碱流加量。可以看出, 未流加葡萄糖时, 发酵前期 0~28 h, 碱添加量增加, 说明黑曲霉生长过程中产生了一部分有机酸。30 h 至发酵结束, 酸添加量迅速升高, 说明此时伴随着一部分细胞衰亡, 碳源不足, 一部分蛋白质氨基酸被分解利用, 导致 pH 值升高。

流加葡萄糖时, 24~48 h 葡萄糖流加过程中碱液流加量一直增高, 说明流加葡萄糖过程中产生了较多的有

机酸, 导致 pH 值降低。50 h 以后, 酸流加量增加, 说明此时细胞在不断衰亡导致 pH 值升高。总之, 玉米浆发酵体系中, 在罐压一定的情况下, 调节通气量也难以明显提高发酵基质中溶氧量, 可以限制好氧微生物高密度生长, 是保持发酵体系保持稳定的重要因素之一。流加葡萄糖可改变玉米浆共生发酵过程中酸碱变化趋势, 流加葡萄糖会使发酵过程中产生大量的有机酸, 可降低玉米浆中碳氮比过低引起的 pH 值过高的情况。

由结果可得, 作为好氧微生物的黑曲霉被体系中的溶氧含量所限制, 避免了黑曲霉的高密度生长成为优势菌株, 从而保持了发酵体系中 3 种菌类共生发酵的稳定性。同时在整个发酵体系中, 从酸碱液的添加来看, 无葡萄糖流加的体系中从 30 h 便有细胞死亡或者蛋白质被分解利用, 添加葡萄糖作为补料的体系中则是在 60 h 才开始出现这种情况。结果表明添加葡萄糖作为流加补料, 大大延长了细胞开始死亡的时间, 可以有效解决体系中因碳源不足导致的 pH 值升高问题, 所以流加葡萄糖作为补料可以增加共生发酵体系的稳定性。

## 2.6 共生发酵过程中发酵液流变特性分析

流变特性可以影响传热传质过程从而对发酵过程产生影响。丝状菌的发酵液受到丝状菌的形态及生物量的影响表现出高黏度高固形物, 因此通过对不同发酵时间的发酵液进行取样, 用旋转流变仪恒温 25 °C 测定, 得到不同剪切应变率下的剪应力和表观黏度。12 个时间点的发酵液黏度和剪应力随剪切应变率的变化如图 6 所示。



随着剪切速率的增加, 发酵液的表观黏度逐渐降低, 出现剪切稀化的现象, 均表现出假塑性非牛顿流体的特性。发酵过程中的发酵液均符合幂律规则式。当剪切速率在  $0 \sim 10 \text{ s}^{-1}$  时, 表观黏度大幅下降, 随后黏度下降趋势变缓, 当剪切速率大于  $20 \text{ s}^{-1}$  时, 稳态剪切曲线趋于水平, 表观黏度值在  $0 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  左右, 说明发酵液在剪切速率一定程度后趋近于一个稳定值, 具有较好的剪切稳定性。  $0 \sim 12 \text{ h}$  发酵悬浮液的黏度均随发酵时间的增加而增加, 这表明随着发酵过程的进行, 黑曲霉迅速生长, 产生了大量的菌丝体和分泌物, 使发酵液成分复杂化, 增强了发酵体系内部的网络结构而使发酵清液黏度稍有升高。同时, 此时发酵液中溶氧含量相对值基本为 0 (图 5), 发酵液中的溶氧均被微生物利用。

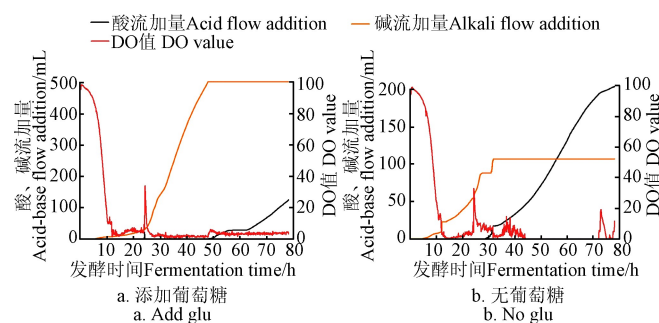


图 5 玉米浆共生发酵过程中溶氧, 酸碱流加量以及 DO 值的过程变化

Fig.5 Process variation of dissolved oxygen, acid-base flow addition and DO value during MSL co-fermentation

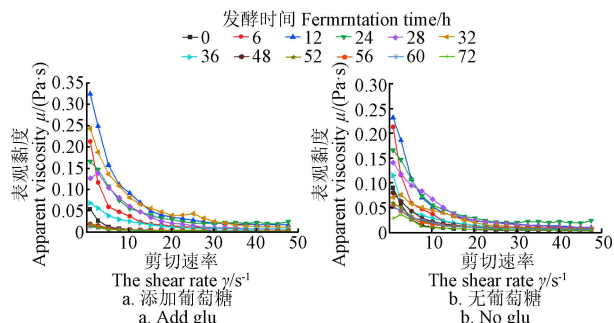
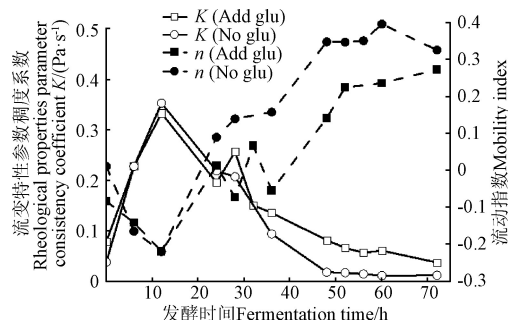


图 6 共生发酵发酵液表观黏度特性分析

Fig.6 Apparent viscosity characteristics analysis of co-fermented fermentation broth

用式 (1) 对图 6 的数据进行幂指数拟合, 得到发酵不同时间的流变特性参数稠度系数  $K$  和流动指数  $n$  的值 (图 7)。假塑性流体  $K$  值越大, 其发酵液黏稠度越大,  $n$  值越小, 其非牛顿流体性质愈加显著。图中可以看出, 发酵初期  $0 \sim 12 \text{ h}$  发酵液稠度系数  $K$  值迅速升高,  $n$  减小;  $12 \text{ h}$  后  $K$  值逐渐减小,  $n$  值逐渐增大。流加葡萄糖后  $24 \sim 28 \text{ h}$ ,  $K$  值增加,  $28 \text{ h}$  后逐渐降低。流加葡萄糖后其发酵液  $K$  值高于玉米浆发酵液, 表明流加葡萄糖后其发酵液黏稠度增加。在整个发酵过程中  $12 \text{ h}$  的  $K$  值最大,  $n$  最小, 说明此时发酵液的非牛顿流体性最强。同时对发酵液的弹性模量 ( $G'$ ) 和黏性模量 ( $G''$ ) 测定 (图 8)。同样在  $12 \text{ h}$  其  $G'$  和  $G''$  含量最高, 且发酵液表现出浓稠性质。随着剪切速率的增加  $G'$  基本呈现稳定状态,  $G''$

逐渐增加, 表明剪切后黏性增强。但是流加葡萄糖对发酵液的  $G'$  和  $G''$  无明显变化。菌丝体的产生对发酵液的稠度系数增长有较大影响。



注:  $K$  是一致性指数,  $n$  是提供有关受剪切速率影响的流动行为信息的指数。

Note:  $K$  is the consistency index and  $n$  is the index that provides information about the flow behavior affected by the shear rate.

图 7 共生发酵发酵液  $K$ 、 $n$  值的变化

Fig.7 Variation of  $K$  and  $n$  values of co-fermented fermentation broth

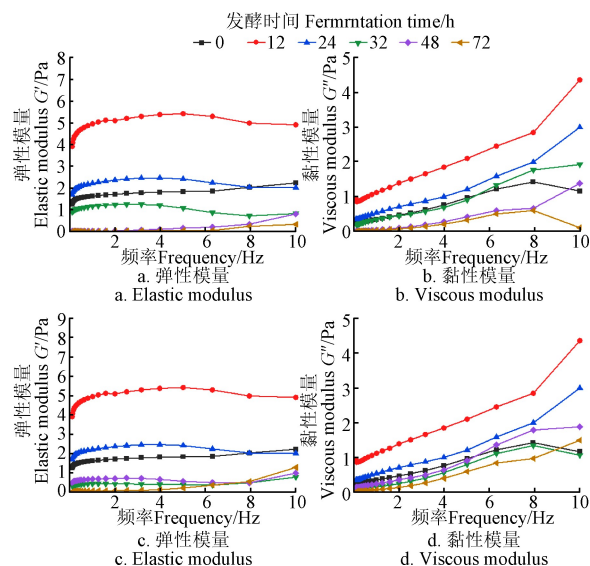


图 8 不同发酵时间的玉米浆发酵液弹性模量与黏性模量

Fig.8 Energy storage modulus and loss modulus of maize pulp fermentate for different fermentation times

### 3 讨论

近年来化肥农药的大量使用造成了水、土壤空气等环境的污染, 生物菌肥的开发可替代化肥农药使用, 减少其产生的负面影响, 同时促进了植物生长、土壤修复。越来越多的研究致力于生物菌肥功能性菌种的选育和应用<sup>[27-29]</sup>, 如一些已经用于农业生产的菌种如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、黑曲霉<sup>[30-33]</sup>等。在本研究中, 从菌肥工业生产中选择的枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、黑曲霉可以产生多种如蛋白酶, 脂肪酶, 淀粉酶, 纤维素酶等酶系, 分解土壤中的有机质, 促进植物根际微生物生长, 提高作物对氮磷钾及中微量元素等的相互协调和吸收率。同时枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌能够产生生长素等促进植物生长<sup>[34]</sup>, 产生的抗菌物质能够抑制多种植物病菌生长<sup>[35]</sup>, 与共生的有益菌种能

长期共存，使土壤微生态平衡；黑曲霉具有优良的解磷、解钾能力，同时可以竞争性抑制其他有害真菌的生长<sup>[36]</sup>。通过将 3 种功能微生物共生发酵，增加了菌肥的多种功能性，同时 3 菌种均可以产生植酸酶，将玉米浆中的有机磷转化为游离磷酸根，被微生物进一步利用。

在发酵过程中先接种黑曲霉可以产生多种有机酸将玉米浆中的不溶性磷转化为可溶性磷，降低玉米浆的渗透压，培养 24 h 后接种枯草芽孢杆菌，它可以在玉米浆发酵系统中迅速生长，同时将黑曲霉的成团的菌丝体剪稀，增加其孢子数量。同时，地衣芽孢杆菌是兼性厌氧菌，避免了发酵液中溶氧不足造成活菌数降低的问题，所以应在发酵后期接种，以提高发酵 pH 值，并分解产生更多的氨基酸供枯草芽孢杆菌在发酵过程中利用。芽孢杆菌与黑曲霉共生系统的建立以及共生系统中黑曲霉数量的增加将在今后的研究中进一步深入研究。

本研究测定了发酵体系中的溶氧参数以及流变系数，体积氧传递系数表征了工程水平发酵罐内的氧传递情况，它与发酵液的流变性质有关<sup>[37-38]</sup>。这种时序变化的混合传质情况进而又会菌体的生长以及产物的生成，从而对生产造成一定的影响。在发酵过程中，作为好氧微生物的黑曲霉被体系中的溶氧含量所限制，避免了黑曲霉的高密度生长成为优势菌株，同时地衣芽孢杆菌是兼性厌氧菌，避免了发酵液中溶氧不足造成活菌数降低的问题。本研究对发酵液的流变特性进行分析显示，黏度系数在 12 h 最大，随后开始降低。黏度越大，体积氧传递系数越小。而溶氧量的降低反过来又会菌体生长以及产物合成。菌丝形态及菌体浓度等会严重影响发酵液的流变特性。随着菌体的生长， $K$  值逐渐增大；后期菌体逐渐衰亡， $K$  值也开始下降。因此菌体浓度过高，严重影响了霉菌发酵液溶氧量的增加，影响其生长代谢。因此应考虑改良发酵罐物理结构或尽可能保持高转速，降低发酵液稠度，提高氧传递系数，使菌株有更高的活性，从而使菌肥具有更高的品质。

虽然关于共生发酵的研究已被广泛报道<sup>[39-40]</sup>，但共培养系统中不同微生物可能会相互抑制<sup>[41]</sup>。本研究评估了三菌种在有添加葡萄糖的玉米浆中共生发酵过程的参数变化，以此模拟结晶葡萄糖母液与玉米浆结合用于共生发酵的过程。结晶糖母液是工业生产精制葡萄糖过程中蒸发浓缩制得的葡萄糖再经过搅拌降温离心分离出晶体后的剩余部分。结晶糖母液中葡萄糖含量约 40%~50%<sup>[25]</sup>，因此在发酵罐分批培养过程中，选用 40%浓度的葡萄糖作为流加补料。试验结果发现流加葡萄糖可以显著提高共生发酵体系中的活菌数量，尤其是发酵后期地衣芽孢杆菌活菌数；同时，流加葡萄糖还可以增加体系中对可溶性磷以及总糖的利用率；以及增加发酵体系的稳定。相反，葡萄糖的流加导致了培养物中氨基酸态氮的含量降低。这可能是在增加细胞量的同时，过高的细胞生长利用了氨基酸态氮，从而导致氨基酸态氮含量降低。至此，本试验模拟结晶葡萄糖母液的添加，有效的将两种工业废料（玉米浆；结晶葡萄糖母液）结

合到了一起，制作出的“废料”培养基营养物质丰富，辅以菌株从而制造出生物菌肥。本研究为两种工业废料的处理再利用提供了选择，对生物肥料的开发以及工业废料的再利用有着积极作用。

#### 4 结 论

本研究通过菌种组合确定了 3 菌种共生发酵生产菌肥。采用延迟接种技术在 5 L 发酵罐中共生发酵，并流加 40 g/L 的葡萄糖作为补料，结果为流加葡萄糖作为补料可显著提升 3 种菌株的生物量，总生物量从  $6.6 \times 10^9$  提升到了  $2.17 \times 10^{10}$  CFU/mL，并且在 52 h 氨基酸态氮含量达到最大。采用葡萄糖模拟结晶葡萄糖母液流加补料使共生体系中溶磷利用率提升了 50%，并且添加葡萄糖还能保持发酵体系的 pH 稳定，奠定了生产稳定以及使用广泛的玉米浆生物菌肥基础。该研究是对玉米浆共生发酵生物菌肥的初步系统研究，并为玉米浆生物肥料的生产提供了系统的生产步骤。

#### 【参 考 文 献】

- [1] 吕小妹, 王利强, 李慧蓉. 玉米综合深加工应用的研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2009(8): 51-53, 57.
- [2] 王继强, 龙强, 李爱琴, 等. 玉米加工副产物的营养特点及其在养禽业上的应用效果[J]. 广东饲料, 2011, 20(5): 30-33.
- [3] Hofer A, Hauer S, Kroll P, et al. In-depth characterization of the raw material maize steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium 19chrysogenum*[J]. Process Biochemistry, 218,70: 20-28
- [4] Jin-dal-rae C, Yu-Sin J, Jung-Hee C, et al. Characterization and evaluation of maize steep liquid in acetone-butanol-ethanol production by clostridium acetobutylicum[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(2): 266-271.
- [5] Azizi-Shotorkhoft A, Sharifi A, Mirmohammadi D, et al. Effects of feeding different levels of maize steep liquor on the performance of fattening lambs[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2016, 100(1): 109-117.
- [6] Zhang J, Jia B. Enhanced butanol production using clostridium beijerinckii Se-2 from the waste of maize processing[J]. Biomass and Bioenergy, 2018, 115: 260-266.
- [7] Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, et al. A potential approach for sustainable agriculture development[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(4): 3315-3335
- [8] Van H V, Kim K. High-cell-density fed-batch culture of *saccharomyces cerevisiae* kv25 using molasses and maize steep liquor[J]. Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(12): 1603-1611
- [9] Rodrigues I, Naehrer K, 张艳, 等. 百奥明: 2012 年全球霉菌毒素调查报告[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(14): 15-18, 23.
- [10] Yang T W, Rao Z M, Zhang X, et al. Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *bacillus subtilis*[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(11): 1610-1617.

- [11] Xu S, Bai Z, Bo J, et al. Bioconversion of wastewater from sweet potato starch production to *Paenibacillus polymyxa* biofertilizer for tea plants[J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 1-7.
- [12] Namfon P, Ratchanok S, Chalida D, et al. Optimization of the liquid biofertilizer production in batchfermentation with by-product from MSG[C]//International conference on chemistry, Chemical Process and Engineering (IC3PE)2017. Las Vegas: AIP Conference Proceedings, 2017, 020074.
- [13] Frank C O. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(11): 4120-4124.
- [14] Yufita D, Kazuki C, Widiastuti A, et al. Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) in hydroponic cultures[J]. J Sci Food Agric, 2014, 94(11): 2317-2323.
- [15] Ezgi B A, Oltan C, Yanis C, et al. Production of bio-based pigments from food processing industry by-products (apple, pomegranate, black carrot, red beet pulps) using *aspergillus carbonarius*[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(4): 240.
- [16] Kayasth M, Kumar V, Gera R, et al. Exploring the potential of PGPR strain *Bacillus licheniformis* to be developed as multifunctional biofertilizer[J]. Central European Journal of Biology, 2013, 2(1): 12-17.
- [17] ElSorra E I, Domingo J, Talon M, et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2007, 20(6): 619-626.
- [18] Mikutta R, Baumgä rtner A, Schippers A, et al. Extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis* associated with minerals modify the extent and rate of heavy metal sorption[J]. Environmental Science Technology, 2012, 46(7): 3866-3873.
- [19] Ye Y, Li Q, Fu G, et al. Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(1): 90-99.
- [20] 周超. 有机肥部分替代化学肥料对苹果园土壤养分和生物活性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- Zhou Chao. Effects of Partial Substitution of Organic Fertilizers on Soil Nutrients and Biological Activity in Apple Orchard[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University.
- [21] 王洪, 喻书文, 张福安. 结晶葡萄糖母液对赖氨酸发酵过程的影响[J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(3): 184-188.
- [22] 刘丽, 曾真, 方萍. 利用味精废液发酵枯草芽孢杆菌的培养基配方优化[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2016, 42(4): 485-494.
- [23] 徐伟东, 许华玉, 范一灵, 等. 胰酪胨大豆培养基和改良马丁培养基的微生物促生长能力考察[J]. 中国药品准, 2013, 14(4): 271-275.
- [24] 蔺泽荣, 朱海霞. 除草活性菌株 HZ-011 发酵培养基筛选及其条件优化[J]. 南方农业学报, 2021, 52(7): 1931-1941.
- [25] 熊杜明, 王书云, 杨立华, 等. 玉米浸泡水利用的研究进展[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(2): 32-35.
- [26] Zhong H, Wang X, He M. Study on monitoring *bacillus subtilis* fermentation process by mid-infrared spectroscopy[J]. Applied Mechanics and Materials, 2014, 667: 368-371.
- [27] 张洁, 朱文倩, 夏明聪, 等. YB-04 生物菌肥防治番茄根结线虫的效果评价[J]. 植物保护, 2022, 48(2): 16-23.
- [28] Joyce K G, Marty R J. Isolation and characterization of *azotobacter vinelandii* mutant strains with potential as bacterial fertilizer[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29(8): 973-978.
- [29] Alejandro J, Ignacio G, Estévez M T, et al. Bacterial fertilizers based on *rhizobium laguerreae* and *bacillus halotolerans* enhance *cichorium endivia* l. phenolic compound and mineral contents and plant development[J]. Foods, 2021, 10(2): 424.
- [30] Liu X, Li Q, Li Y, et al. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth[J]. PeerJ, 2019, 7: e7445.
- [31] Praveena R, Srekha K, Revathy R, et al. New rhizobacteria strains with effective antimycotic compounds against rhizome rot pathogens and identification of genes encoding antimicrobial peptides[J]. Rhizosphere, 2011, 22: 100515.
- [32] Li L, Ishikawa Y, Mihara M. Effects of adding *bacillus* sp. on crop residue composting and enhancing compost quality[J]. International Journal of Environmental and Rural Development, 2013, 4(2): 115.
- [33] Irina N, Vladislav M, Julia T et al. New polyfunctional biorationals use to achieve competitive yield of organic potatoes in the north-west russian ecosystem[J]. Plants, 2022, 11(7): 962.
- [34] Luis A, Chaparro-E, Fannie I, et al. Transcriptional regulation of cell growth and reprogramming of systemic response in wheat (*triticum turgidum* subsp. *durum*) seedlings by *bacillus paralicheniformis* trq65[J]. Planta, 2022, 255(3): 56.
- [35] Wang D, Li Y, Yuan Y, et al. Identification of non-volatile and volatile organic compounds produced by *bacillus siamensis* lz88 and their antifungal activity against *alternaria alternata*[J]. Biological Control, 2011, 169: 104901.
- [36] Choi H W, Ahsan S M. Biocontrol activity of *aspergillus terreus* anu-301 against two distinct plant diseases, tomato fusarium wilt and potato soft rot[J]. Plant Pathol J, 2022, 38(1): 33-45.
- [37] 周少奇, 姚汝华, 罗立新. 发酵液的流变学与发酵过程控制的关系[J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 1997, (S1): 89-92.
- [38] 杭海峰, 夏建业, 郭美锦, 等. 灰黄霉素发酵液的流变特性[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 130-132.
- [39] Bader J, Mast-Gerlach E, Popović M K, et al. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(2): 371-387.
- [40] Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse[J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 173-178.
- [41] Zuroff T R, Xiques S B, Curtis W R. Consortia-mediated bioprocessing of cellulose to ethanol with a symbiotic *Clostridium phytofermentans*/yeast co-culture[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 59.



## Symbiotic fermentation characteristics of biotransformed maize pulp for biofertilizer production

Ren Xiaojie<sup>1,2</sup>, Ban Heng<sup>1</sup>, He Zhuangzhuang<sup>1</sup>, Wang Xiaolong<sup>3</sup>, Zhao Yubin<sup>4</sup>, Song Yuanda<sup>1</sup>, Zhao Xinhe<sup>1,4,5\*</sup>

(1. Colin Rateldye International Research Center of Mircobial Lipids, School of Agriculture Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255000 China; 2. Shandong Fuyang Biotechnology Co. Ltd., Dezhou 253000, China; 3. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing 100015, China; 4. Luzhou Bio-chem Technology Co. Ltd., Linyi 276400, China; 5. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** Maize deep processing has been the second-largest agricultural processing industry in the world. The products (such as starch sugar, maize oil, and crude fiber) have been very important food and chemical raw materials. Among them, maize starch is currently the main resource for the production of glucose syrup and various sugar derivatives. However, the preparation process of maize starch can produce a large number of by-products, such as Maize Steep Liquor (MSL). Alternatively, the maize pulp has been confined during processing, due to the dark color, heavy taste, high toxin content, and difficult handling. Particularly, maize pulp presents great potential in the field of bio-exploitation, due to a large number of nutrient contents with more than 40% nitrogen and more than 25% carbohydrates. Therefore, a cheap nitrogen source can be served for the fermentation production of bioproducts. This study aims to develop microbial fertilizers using the abundant source of fast-acting nitrogen in the maize pulp and the growth-promoting factors of microorganisms. The slow release and degradation of toxins by soil were avoided to reduce the direct toxicity of biotoxins to humans and livestock. A systematic evaluation was made on the high-density fermentation of three strains of plant inter-rhizosphere growth-promoting bacteria (PGPMs) in the maize pulp. The fermentation characteristics were investigated via the symbiotic fermentation of three strains of PGPMs that screened in the previous stage. The experimental results showed that the three species significantly increased the biomass in the fermentation system after the symbiotic fermentation. The flow addition of starch industrial waste (crystalline glucose mother liquor) was taken as a supplement during the simulation. The total biomass was elevated from  $6.6 \times 10^9$  to  $2.17 \times 10^{10}$  CFU/mL in the fermentation system. The maximum viable bacterial count and amino acid nitrogen were obtained at the end of 45 h fermentation. Meanwhile, the glucose was added in the mimic crystalline glucose mother liquor flow in the symbiotic system. Then, there was a significant increase in the utilization of total sugars and soluble phosphorus. Specifically, the soluble phosphorus utilization increased by nearly 50%. The addition of glucose also maintained the stable pH value in the fermentation system, particularly for the stable production of bacterial fertilizer. This finding can provide a better solution and practical basis for the reuse of maize pulp in the production of low-cost biofertilizers using a variety of bacteria. The high value-added reuse of crystalline glucose mother liquor can be produced using the waste of maize starch.

**Keywords:** bacteria; fermentation; Maize Steep Liquor (MSL); biofertilizer; inter-root promoting bacteria; microecology