

金针菇在淀粉废水中发酵的营养条件研究

朱 辉¹ 何国庆²

¹(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

²(浙江大学食品科技系 杭州 310029)

摘 要 用摇瓶试验对金针菇菌丝体在淀粉废水中培养的营养条件进行了研究。结果表明,利用淀粉废水进行金针菇液体发酵的最适营养条件为:经液化处理的淀粉废水,加 KH_2PO_4 0.25 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/100mL, V_{B_1} 150 $\mu\text{g/L}$, V_{B_2} 50 $\mu\text{g/L}$, pH5.40。测定了该营养条件下菌体的生长曲线及发酵过程中培养基残糖的变化。发酵周期为 7d, 发酵终点生物量达 2.08 g/100 mL, COD 去除率为 70.8%。

关键词 淀粉废水, 金针菇, 营养条件, 生物量

分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0512-16

淀粉工业废水含有较高的有机质,直接排放会引起严重的环境污染,但同时它是潜在的可利用资源^[1]。国内外的报道已证实利用淀粉废水发酵生产酵母、霉菌、细菌的细胞蛋白(SCP)是减轻废水对环境的污染、化废为宝的一条有效途径^[2-5]。但这类 SCP 产品由于核酸含量高、无肉质、不合人们口味而限制了其应用范围。同样作为一种菌体蛋白,食用菌菌丝体有着与子实体相近甚至更高的营养价值,与其它 SCP 产品相比,营养结构更为合理,并解决了人们对 SCP 产品安全性和口味的顾虑,应用范围更广^[6]。特别是近年来人们陆续从一些食用菌的子实体和菌丝体中提取到能提高机体免疫能力的食用菌多糖^[7],使人们对食用菌培养的兴趣更加浓厚。我们曾对金针菇在小麦淀粉废水中的生长适应性和发酵过程中的生理生化特性进行了研究^[8],发现其能在淀粉废水培养基中生长,但由于淀粉废水中某些营养因子的缺乏,使菌体内部的代谢机制受到阻抑,从而影响生物量的进一步提高,而部分营养因子的加入可以促进菌体在废水中的生长。本试验在了解小麦淀粉废水各组分含量的基础上,从利用淀粉废水的角度考虑,研究了 K、Mg、P、S 等金针菇生长所需的大量元素和 V_{B_1} 、 V_{B_2} 等营养因子及 pH 对金针菇在淀粉废水中生长的影响,获得了合适的营养条件,为工业化利用淀粉废水生产金针菇菌丝体、减轻淀粉废水对环境的污染提供了技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 金针菇杂交 19, 浙江农业大学食用菌研究所提供。

1.1.2 淀粉废水: 杭州东南生化厂所采小麦淀粉废水。经液化处理后,测得还原糖含量

为 1.05 g/100 mL, 总糖 2.66 g/100 mL, 粗蛋白 0.28 g/100 mL, K:60 mg/L, Mg:20 mg/L, P:72 mg/L, 灰分 440 mg/L, COD(化学需氧量)含量为 40474 mg/L。

1.1.3 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 V_{B1} 、 V_{B2} 均为化学纯。

1.2 方法

1.2.1 淀粉废水液化工艺: 淀粉废水调 pH6.0, 加 α -淀粉酶 12 u/mL, 加热至液化完全^[1]。

1.2.2 种子培养基: PDB 培养基。

1.2.3 正交试验设计: 淀粉废水经液化完全后, 按 $\text{L27}(3^3)$ 正交表设计培养基配方^[9]。因素及水平见表 1。对照 CK 为淀粉废水经液化后, 不加其它营养物质, 调 pH6.40。

1.2.4 单因子试验: 以上述正交试验结果为基础, 对主要因子分别进行单因子 4 水平试验。

1.2.5 最佳营养条件试验: 根据正交试验及单因子试验结果, 确定最佳营养条件, 进行发酵试验。

1.2.6 发酵培养基灭菌条件: 115℃、30 min。

1.2.7 培养条件: 在 500 mL 的三角瓶中装 100 mL 培养液, 接种量 10%, 培养温度 25℃, 摇床转速 110 r/min, 先静置 12 h 后再开始旋转培养^[8]。

1.2.8 取样方法: 对发酵 8d 后的样品进行测定, 每次重复测定 3 个样品。

1.2.9 生物量测定: 发酵液用一层纱布过滤后, 菌丝体用蒸馏水反复冲洗, 70~80℃ 干燥至恒重后称重。

1.2.10 总糖、还原糖、K、Mg、P 测定见《工业发酵分析》^[10]。

1.2.11 COD 测定见《环境监测分析方法》^[11]。

表 1 正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

Level	Factor				
	A(KH_2PO_4)	B($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	C(V_{B1})	D(V_{B2})	E(pH)
1	0.10 g/100 mL	0.05 g/100 mL	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	5.60
2	0.15 g/100 mL	0.75 g/100 mL	75 $\mu\text{g/L}$	75 $\mu\text{g/L}$	6.00
3	0.20 g/100 mL	0.10 g/100 mL	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	6.40

2 结果与分析

2.1 正交试验方案及结果

按正交表 $\text{L27}(3^3)$ 设计培养基。考虑 C 和 E、C 和 D 的交互作用, A、B、C、D、E 分别为第 1 列, 第 2 列, 第 7 列, 第 8 列, 第 9 列, C×E、C×D 分别第 11 列和第 12 列。以发酵 8 d 所得的生物量为试验指标, 正交表及结果分析如表 2。

与对照相比, 各试验组的生物量均有较大幅度的增高, 说明营养条件的调整能显著促进菌体在淀粉废水中的生长, 但各试验组之间存在着一定的差异。从正交试验得到最优

的培养基配方为:淀粉废水经液化后,加 KH_2PO_4 0.02 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/100 mL, V_{B1} 100 $\mu\text{g/L}$, V_{B2} 50 $\mu\text{g/L}$, 调 pH5.60。各因素中, KH_2PO_4 是最显著因素, pH 次之, V_{B1} 略次之, 其余依次为 V_{B1} 和 pH 的交互作用、 V_{B2} 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 V_{B1} 和 V_{B2} 交互作用。后四者均不显著。因此, 对 3 个主要因素进行了进一步的研究, 以摸索更加合理的营养条件。

表 2 正交试验的方案及结果分析

Table 2 The design and result analysis of the orthogonal experiment

Test No.	A (KH_2PO_4)	B (MgSO_4)	C (V_{B1})	D (V_{B2})	E (pH)	C×E	C×D	Biomass yield (g/100 mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	1.6730
2	1	1	2	2	2	2	2	1.5195
3	1	1	3	3	3	3	3	1.7676
4	1	2	1	2	2	3	3	1.5788
5	1	2	2	3	3	1	1	1.5936
6	1	2	3	1	1	2	2	1.6799
7	1	3	1	3	3	2	2	1.4379
8	1	3	2	1	1	3	3	1.7181
9	1	3	3	2	2	1	1	1.6445
10	2	1	3	1	2	1	2	1.8935
11	2	1	1	2	3	2	3	1.5518
12	2	1	2	3	1	3	1	1.6536
13	2	2	3	2	3	3	1	1.6689
14	2	2	1	3	1	1	2	1.7613
15	2	2	2	1	2	2	3	1.5131
16	2	3	3	3	1	2	3	1.6101
17	2	3	1	1	2	3	1	1.7348
18	2	3	2	2	3	1	2	1.5266
19	3	1	2	1	3	1	3	1.5914
20	3	1	3	2	1	2	1	1.9530
21	3	1	1	3	2	3	2	1.7898
22	3	2	2	2	1	3	2	1.9062
23	3	2	3	3	2	1	3	1.5921
24	3	2	1	1	3	2	1	1.9514
25	3	3	2	3	2	2	1	1.5056
26	3	3	3	1	3	3	2	1.6920
27	3	3	1	2	1	1	3	1.8942
Kj1	1.6236	1.7103	1.7081	1.7163	1.7612	1.6856	1.7087	A>E>C>
Kj2	1.6571	1.6940	1.6142	1.6936	1.6413	1.6359	1.6896	CE>D>B>CD
Kj3	1.7640	1.6404	1.7225	1.6347	1.6424	1.7234	1.6464	
Rj	0.1404	0.0699	0.1083	0.0816	0.1188	0.0875	0.0623	A3E1C3D1B1

CK: Biomass yield 0.9127 g/100 mL.

2.2 主要因素的单因子四水平试验

在上述最优营养条件的基础上, 对 KH_2PO_4 , V_{B1} 添加量及 pH 进行单因子 4 水平试验。各因子试验时, 培养基中其它营养条件按上述最优营养条件 A3E1C3D1B1 配制。发酵 8d 后, 对各试验组的生物量进行测定, 试验方案和结果如表 3。

表 3 单因子试验方案与结果

Table 3 The design and results of the single-factor experiment

Factor	Level	Biomass yield(g/100 mL)
A: KH_2PO_4	(1) 0.20 g/100 ml	1.5858
	(2) 0.25 g/100 mL	1.9579
	(3) 0.30 g/100 mL	1.8690
	(3) 0.35 g/100 mL	2.0101
C: V_{BI}	(1) 100 $\mu\text{g/L}$	1.5858
	(1) 150 $\mu\text{g/L}$	1.8030
	(1) 200 $\mu\text{g/L}$	1.7534
	(1) 150 $\mu\text{g/L}$	1.5898
E: pH	(1) 5.80	1.3368
	(2) 5.60	1.5858
	(3) 5.40	1.8940
	(4) 5.20	1.7733

确定利用淀粉废水液体深层发酵的培养基最佳配比为:淀粉废水经液化完全后,外源添加 KH_2PO_4 0.25 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/100 mL, V_{BI} 150 $\mu\text{g/L}$, V_{B2} 50 $\mu\text{g/L}$, 调 pH5.40。

金针菇杂交 19 在上述最佳营养条件下发酵,每隔 24 h 测定培养基总糖、还原糖含量及生物量,得到了金针菇杂交 19 在经营调整后的淀粉废水培养基中的生长曲线及发酵过程中培养基残糖变化(图 1)。培养基经营养调整后,菌体的生长速度加快,菌球数量增多,生物量提高,发酵周期缩短至 7d,残糖含量也有一定程度的降低。发酵结束时,生物量达到 2.08 g/100 mL,残糖降低至 0.88 g/100 mL。经测定,发酵滤液的 COD 含量为 11818 mg/L,与淀粉废水相比,COD 去除率为 70.8%。

3 讨 论

在本试验所确定的淀粉废水培养基中,金针菇菌丝体生长良好,生物量达到了较高水平。这说明经营调整后的淀粉废水,适合于金针菇的液体发酵。与常规的利用合成培养基发酵生产金针菇菌丝体相比,本试验在生物量上无明显差别(如有人用玉米粉 3%、糖蜜 1.5%、黄豆粉 1%、酵母粉 0.2%、蛋白胨 0.2% 及适量无机盐,得生物量 2.32 g/100 mL^[12]),而培养基成本则大大降低。

金针菇菌丝体有较高的食用价值和药用价值,对预防和治疗多种疾病有效,在食品和医药方面有较多的应用。特别是近年来人们从金针菇菌丝体中提取到金针菇多糖,已证

在不同的营养水平下,生长情况有一定的差别,其中 A(2)、C(2)、E(3)在各组中生长速度最快,菌体比其它试样多。到第 8 天时,发酵滤液颜色呈深棕色,菌体已出现老化。说明它们已经过了发酵终点。综合考虑生物量及生长情况,确定上述 3 因子的最适配比为 KH_2PO_4 0.25 g/100 mL, V_{BI} 为 150 $\mu\text{g/L}$, pH5.40。

2.3 最适营养条件下的发酵试验

根据以上的研究结果,确

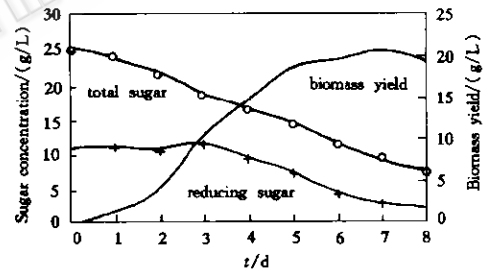


图 1 发酵过程中生物量,总糖,还原糖的变化

Fig. 1 The variation of biomass yield, total sugar, reducing sugar during fermentation

明其对提高机体免疫能力、抑制实验性动物肿瘤方面有显著的作用^[7]。使得金针菇菌丝体的需求量日益增大。

本研究开辟了一条利用废弃资源生产高附加值的金针菇菌丝体的有效途径。试验所确定的外源添加物成本低廉,营养条件粗放,适合于工业化生产,有广阔的应用前景。

COD 含量是衡量有机废水污染能力的一个重要指标,COD 去除率是评价废水处理效果的一种重要手段。从现有的报道看,用酵母、细菌、霉菌来处理淀粉废水,COD 去除率一般在 50%~60%左右^[2-4]。本试验 COD 去除率达到 70.8%,显著地降低了淀粉废水的污染指标。由此可见,利用金针菇发酵处理淀粉废水,对减轻环境污染有着重要的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 何国庆,朱 辉,陈忠明等.浙江农业学报,1997,9(5):235~239.
- [2] 于伟君,石俊艳,王 丹等.饲料工业,1991,12:20~21.
- [3] R. Jamuna. *J. Ferment. Bioengineering*, 1989, 67(2):126~131.
- [4] M. C. Rubio. *Bio. Wastes*, 1989, 29(3):221~228.
- [5] V. B. Manilal. *J. Microbiology. Biotech.*, 1991, 7(2):185~190.
- [6] 上官舟健.中国食用菌,1988,7(1):15~16.
- [7] 黄年来主编.自修食用菌学,南京:南京大学出版社,1987.
- [8] 朱 辉,何国庆,尹源明.杭州:浙江农业大学学报,1997,23(6):659~662.
- [9] 栾军编.试验设计的技术和方法,上海:上海交通大学出版社,1987,224~225.
- [10] 天津轻工业学院等编.工业发酵分析,北京:中国轻工业出版社,1980.
- [11] 国家环保局.环境监测分析方法,北京:中国环境科学出版社,1986,153~156.
- [12] 方海洲,梁世中,陈碧坚等.生物工程学报,1993,9(4):379~382.

The Nutrition Requirement of Submerged Culture of *Flammulina velatipes* in Starch Processing Wastewater

Zhu Hui¹ He Guoqing²

¹(Biotechnology Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310029)

²(Department of Food Science & Technology of Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract The nutrition requirement of submerged culture of *Flammulina velatipes* in starch processing wastewater by flask was studied. The results showed that the optimal formulation of the medium was the liquefied wastewater with the addition of KH_2PO_4 0.25 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/100 mL, V_{B_1} 150 $\mu\text{g/L}$, V_{B_2} 50 $\mu\text{g/L}$, the pH was adjusted to 5.40. Growth curve of the microorganism under the nutrition condition was described, and retaining sugars of the medium during fermentation were investigated. The span of fermentation was 7 days. At the end of fermentation, the biomass yield reached 2.08 g/100 mL, and 70.8% COD of the wastewater was removed by the microorganism.

Key words Starch processing wastewater, *Flammulina velatipes*, nutrition requirement, biomass