

蕈菌云芝用于酒精废液生物漂白及 收获菌丝体的研究

冉艳红¹ 于淑娟²

(1. 暨南大学生命科学技术学院生物工程系, 广东 广州 510632;

2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:利用蕈菌云芝对不同稀释度酒精废液进行生物漂白及收获菌丝体研究。摇瓶培养结果表明,云芝对 20% 的酒精废液的脱色率为 50%, 生物量为 8.1 g/L。培养过程中培养液 pH 值呈上升趋势。利用 5 L 发酵罐, 通过控制发酵过程中 pH 值和通气量, 培养 54 h, 使脱色率上升到 65%, 生物量增加到 10.9 g/L, COD 去除率为 71%; 通过检测发酵液中还原糖变化规律表明云芝对废水中的有色物质有分解利用的过程。与其他生物法处理酒精废液相比, 云芝表现出较强的有机负荷承受能力、脱色能力及运行周期短的优势。

关键词:云芝; 酒精废液; 生物漂白; 菌丝体

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)04-0043-03

Study on decolorization of molasses spent wash and production of mycelium by *Coriolus versicolors*

RAN Yan-hong¹, YU Shu-juan²

(1. Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510640, China;

2. College of Food and Biotechnology, Southern China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The decolorization capacity and production of mycelium of *Coriolus versicolors* cultured in different times diluted molasses spent wash were studied. The result of shake culture shows that 8.1 g/L of mycelium and 50% of decolorization rate could be gotten in 5 times diluted waste water by *Coriolus versicolors*. The pH value shows a raise tendency during cultivation. When *Coriolus versicolors* cultured in a 5 L bioreactor, through best control of ventilatory capacity and pH value, it could reach 65% of decolorization rate, 10.9 g/L of mycelium production and 71% of COD reduction after 54h of cultivation. The curve of glucose during cultivation show that *Coriolus versicolors* is able to efficiently biodegrade colorants. Compared with other biotreatment of molasses spent wash, the treated waste water with *Coriolus versicolors* shows superity such as in COD reduction, more efficient biodegradation of colorants, higher biomass production and shorter cycle of process.

Key words: *Coriolus versicolors*; molasses spent wash; decolorization; mycelium

酒精废液是糖厂糖蜜经酵母发酵、蒸馏酒精后的废液, 其中含有大量有色物质, 主要是焦糖色素、美拉德反应产物、碱降解色素、酚类色素等分子结构还不清楚的大分子, 呈棕黑色。这些色素有不易降解、耐温及对氧稳定的特点, 是造成酒精废液化学耗氧量(COD)、生物耗氧量(BOD)居高不下的主要原因。当前我国对糖厂酒精废液的生物治理主要采用的厌氧接触法、生物污泥法、厌氧生物膜法^[1], 但都不能有效去除有色物质。对于酒精废液脱色处理的研究报道主要分 3 种, 一是利用膜分离提取色素物

质, 二是活性炭脱除技术, 三是高梯度磁分离技术, 前两者成本较高, 第三种方法有产生更高色度的洗脱液问题^[2], 均未能实现工业化应用。

云芝(*Coriolus versicolors*), 属多孔菌科(*polyporaceae*)云芝属, 是一种木腐性的药用食用蕈菌, 有很高的营养与医疗保健价值^[3], 云芝也具有强烈降解木素能力, 又被隶属为白腐菌。进入 20 世纪 90 年代以来, 纺织、印染、制浆造纸行业有色工业废水通过引入白腐真菌进行生物漂白效果理想^[4-5]。国内外还未见将云芝用于酒精废液生物漂白的研究报道。

收稿日期: 2003-12-16

基金项目: 暨南大学引进优秀人才启动基金和广东省国际合作科技攻关项目(No. 2KM 06502W)

作者简介: 冉艳红(1975-), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物化工方面的研究; 于淑娟(1955-), 女, 博士, 教授, 主要从事生物化工方面的研究, 通讯联系人, 020-85228422, lfshujyu@scut.edu.cn。

因为云芝菌丝体的生长不需要光照,营养要求简单,不受糖厂深色的废水遮光作用的影响,笔者在前期实验中已筛选到一株对酒精废液中色素降解能力较强的云芝菌株^[6],现在又将其应用于酒精废液颜色治理中,旨在用酒精废液培养云芝,在对废水生物漂白、治理环境污染的同时,提取可作为药用和食品开发原料的菌丝体。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

云芝菌种为实验室筛选并保存;酵母酒精废液由广西贵港糖厂提供。

种子液:将云芝菌种子液用梯度浓度的酒精废液进行驯化两代后,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 主要仪器设备

原子吸收光谱仪,Z-5000 型,日本日立公司;紫外分光光度计,DU-7HS 型,美国 Beckman;水浴两用振荡器,SHZ-B 型,上海悦丰仪器仪表有限公司;手提式电热式高压灭菌器,YX280 型,广州医疗器械厂;酸度计,pHS-25 型,上海雷磁仪器厂;电热恒温箱,HHB1 型,广州医疗器械厂;5 L 发酵罐,美国 NBS 公司。

1.3 实验方法

将酒精废液样品相应倍数稀释,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液调 pH 值至 7.0,测定 420 nm 的吸光度值 A 。计算色值 $IU = 1\ 000 \times (A/bc)$,式中 b 为比色皿厚度,cm; c 为样品固溶物浓度,g/mL; $c = \text{折光锤度} \times \text{相应视密度}(20^\circ\text{C})/100$ 。

酒精废液金属元素含量测定采用原子吸收法。还原糖的测定采用斐林氏容量法。含氮量的测定采用微量凯氏定氮法。COD 的测定采用标准重铬酸钾法。

取不同浓度的酒精废液各 250 mL,置 500 mL 三角瓶中灭菌,接入云芝液体种子,摇瓶培养,取发酵前后的培养液,测定色值,计算脱色率。

将液体培养的云芝菌丝体离心分离(3 000 r/min,15 min),蒸馏水洗净,65℃ 烘干至恒重,用电子天平称取其质量。

2 结果与分析

2.1 原始酒精废液成分分析

为减少因原料不同而造成的实验误差,本研究均采用同一批酒精废液进行试验。试验所用酒精废液的成分分析如表 1 所示。酒精废液中的残糖、氨

基酸以及 Ca、Mg 的含量均高于云芝生长的需求。要通过适当的稀释,各成分才可以达到云芝生长的要求。

表 1 原始酒精废液成分分析

指标	色度 IU	还原糖质量浓度/ g·L ⁻¹	pH 值	COD/ mg·L ⁻¹	全氮含量/ mmol	氨基态氮 含量/ mmol
含量	120000	10.8	5.1	84800	178	100
指标	Ca 浓度/ mol·L ⁻¹	Cu 浓度/ mol·L ⁻¹	Fe 浓度/ mol·L ⁻¹	Mg 浓度/ mol·L ⁻¹	Mn 浓度/ mol·L ⁻¹	Zn 浓度/ mol·L ⁻¹
含量	0.082	14.12	83.5	170	0.63	1.37

2.2 酒精废液浓度对云芝生长及脱色能力的影响

采用不同稀释倍数的酒精废液直接培养云芝,观察其生长及生物漂白能力。将酒精废液 2~5 倍稀释,考虑到实际应用的成本而没有将酒精废液进一步稀释。摇瓶培养 5 天,检测各处理脱色率与生物量,结果如图 1 所示。菌体生物量随废液浓度的增高而降低,在高浓度的酒精废液中云芝生物量较低。分析原始酒精废液成分可知是因为浓度高的酒精废液还原糖含量高,对菌株的渗透压增大,造成菌体的生长受到抑制。

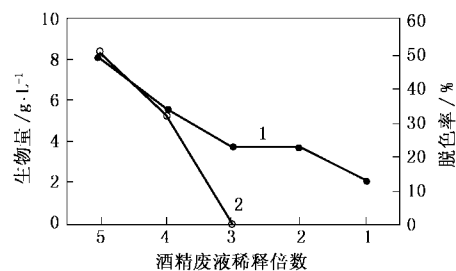


图 1 不同浓度酒精废液对云芝生长能力及脱色能力的影响

当酒精废液 3 倍稀释时,云芝对酒精废液的脱色率为零,因为云芝分泌的胞外降解酶是氮限制型的,在浓度高的酒精废液中氮含量也高,限制了启动分泌胞外降解酶的条件。即在高浓度的酒精废液中,在培养 5 天的条件下云芝还没有分泌降解色素成分的酶。

在 5 倍稀释的酒精废液中云芝虽可以正常生长,但对废水生物仅具有 50% 的脱色能力。在前期实验中,云芝对模拟废水可以达到大于 70% 的脱色率^[7],故还需要进一步研究造成云芝对酒精废液脱色率较低的原因。在云芝酒精废液摇瓶培养过程中,发现随发酵时间的延长而升高,会闻到刺鼻的氨

味,可能会导致培养液的 pH 值发生大的变化。而且实验还发现脱色率达到一定程度,随培养时间的延长,虽然菌体生物量在增加,但脱色率不再增加。

2.3 云芝酒精废液摇瓶培养过程中 pH 值的变化规律

pH 值的变化规律如图 2 所示,随摇瓶培养时间的延长,培养液的 pH 值呈上升趋势,最终 pH 值可以达到 8.0。前期实验表明,白腐菌云芝胞外降解酶的最适作用 pH 值为 4.0~4.5。培养过程中 pH 值的升高是造成培养后期云芝对 5 倍稀释的酒精废液脱色率不能升高的原因。

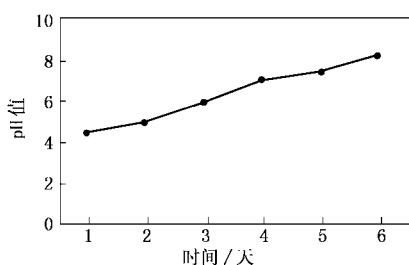
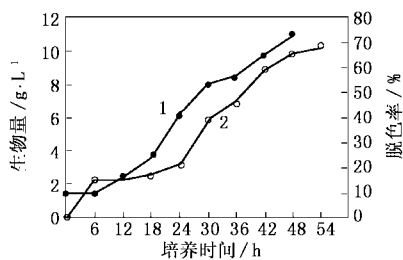


图 2 酒精废液云芝摇瓶生物漂白过程中 pH 的变化规律

2.4 5 L 发酵罐培养过程中生物量与脱色率的变化

采用 5 L 自控发酵罐,装液量 2.5 L,接种量 15%,菌体培养温度 30℃,菌体生长旺盛期调节培养温度为 29℃,发酵初期调节 pH 在 4.0 左右,培养过程通过滴加 0.2 mol/L 的硫酸自动控制 pH 在 4.0 左右,调整通气量为 3.3 L/min,发酵过程视起泡情况流加消泡剂,培养基为 5 倍稀释的酒精废液。



1—生物量;2—脱色率

图 3 酒精废液云芝生物漂白过程中生物量与脱色率的变化

在发酵罐培养过程中通过调整搅拌速度及通气量来保证培养液中的溶氧值(DO)不低于 30,发酵过程中生物量与脱色率的变化趋势如图 3 所示,48 h 时生物量已达到最大 10.9 g/L,超过 48 h,生物量呈下降趋势,培养到 54 h,脱色率达到 65%,比用摇瓶培养脱色率提高了 27%。发酵罐培养过程溶氧、pH 值的控制及搅拌扩大菌体与培养基的接触面积是导

致脱色率及生物量升高的原因。

2.5 5 L 发酵罐酒精废液云芝生物漂白过程中还原糖含量的变化

菌体对有色物质的降解活动可由发酵过程还原糖的变化规律反映出来,云芝 5 L 发酵罐酒精废液发酵过程中还原糖含量的变化趋势如图 4 所示,发酵液中的还原糖的变化呈有升有降的阶梯状下降的趋势,是由于一部分被菌体利用,而又有新的还原糖由胞外降解酶降解大分子色素物质产生,还原糖含量下降的速率大于新合成的速率。发酵达到 54 h 时,还有残余的 0.9%。

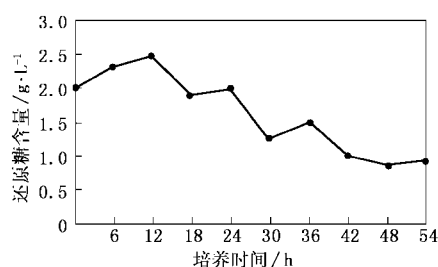


图 4 酒精废液云芝生物漂白过程中还原糖含量的变化

2.6 云芝对酒精废液 COD 的去除率

5 倍稀释的酒精废液的 COD 为 16 000,在发酵罐中云芝生物处理 54 h,脱色率达到 65%,发酵液 COD 为 6 000,COD 去除率为 63%,将培养液经过 0.45 μm 的超滤膜抽滤,除去其中的云芝的代谢产物云芝多糖,滤液的 COD 为 4 600,与原始的酒精废液相比,COD 的去除率达到 71%。

3 结论

进行了云芝用于酒精废液生物漂白及收获菌丝体的初步研究,将原始酒精废液 5 倍稀释,调整初始 pH 值为 4.0。5 L 发酵罐扩大培养 54 h,生物量达到最大值 10.9 g/L,脱色率达到 65%,COD 去除率为 71%。与一般的生物法处理酒精废液相比,云芝表现出较强的对废水有机负荷的承受力,有机负荷在高于 10 g/L 时,仍可以良好地生长,大大降低了酒精废液进行预处理及稀释的成本,另外,COD 去除效率相当,具有可以获得对废水较高脱色效果以及大大缩短运行周期的优势。但由于受到了过高氮含量的抑制作用,云芝对酒精废液的脱色率低于模拟废水培养结果。在以后的研究中,将通过适当方法降低氮浓度来提高云芝对酒精废液的漂白效果及生物量。

(下转第 47 页)

心2 min(10 000 r/min)后,取 10 μ L 有机相进行气相色谱分析。根据4-氯-3-羟基丁酸乙酯,正辛醇的出峰峰高和事先测出的相对校正因子,可计算出反应液中4-氯-3-羟基丁酸乙酯的浓度。

产物对映体过量值的测量所用仪器为数字式自动旋光仪(WZZ-1S型,上海物理光学仪器厂)。在反应结束后取反应液 10 mL,加入 10 mL 乙酸乙酯,用振荡器振荡混合 5 min,再离心(3 500 r/min) 10 min 使两相分层;将有机相移入旋光管,补加乙酸乙酯至充满,充分混合后,测定旋光度 α 值。从测好旋光值的有机相中取样 1 mL,加 40 μ L 十三烷(内标物),混匀后取 10 μ L 进行气相色谱分析。根据4-氯-3-羟基丁酸乙酯与十三烷的出峰峰高和事先测出的相对校正因子计算出旋光管中4-氯-3-羟基丁酸乙酯的浓度 c 。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种对转化反应的影响

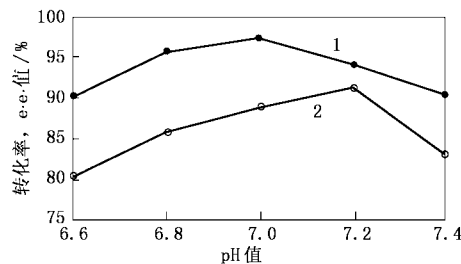
张金红等^[1]实验证明:不同的菌种对同一种的化合物转化效果不同。本实验结果亦显示不同的菌种对4-氯-乙酰乙酸乙酯的转化效果有较大差别,其中酵母2的产物得率和产物对映体过量百分数(e.e.值)都较理想,具有大规模工业生产价值。

表1 不同菌种对转化反应的影响

菌种	产率/%	e.e. 值/%
酵母1	88.2	52.5
酵母2	82.7	96.3
酵母3	85.2	61.7
酵母4	82.0	68.9

2.2 pH值对转化反应的影响

将反应体系的pH值控制在不同范围,其余条件不变,测定不同的酸碱度对转化反应结果的影响,结果如图1。实验结果显示:pH值不仅影响反应速度,而且影响产率和产物e.e.值。这与姜文勇^[2]等的试验结果相似。图1表明使用酵母细胞进行转化反应适宜的pH值为7.2。

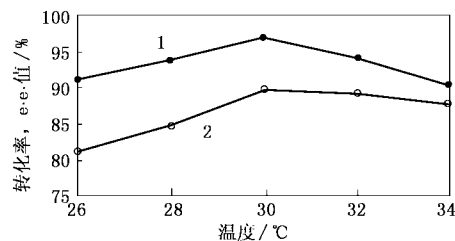


1—e.e. 值;2—转化率

图1 pH对转化反应的影响

2.3 温度对转化反应的影响

反应温度低于30 $^{\circ}$ C时,随着温度的升高,产率及产物的e.e.值逐渐增大,高于30 $^{\circ}$ C后,e.e.值继续缓慢增大,但产率却显著下降。其原因可能是因为温度过高,底物开始挥发并且水解速度加快,最终导致产物得率下降。由图2中可看出反应温度为30 $^{\circ}$ C时,转化反应的效果最为理想。



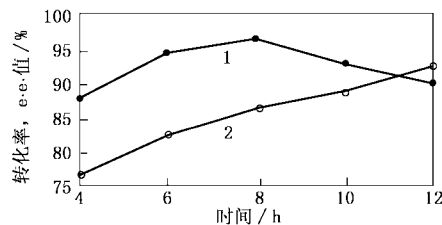
1—e.e. 值;2—转化率

图2 温度对转化反应的影响

2.4 反应时间对转化反应的影响

反应时间过短,则底物转化不完全,底物利用率低,产物得率低;反应时间过长,产物得率升高,但由于产物开始出现消旋化,所以其e.e.值亦开始下降。

图3是反应时间对转化反应的影响。



1—e.e. 值;2—转化率

图3 反应时间对转化反应的影响

(上接第15页)

参考文献

[1] 欧胜彬,杨辉,等.[J].广西轻工业,2002,(4):10-12.
 [2] 吴振强,梁世中.[J].环境污染与防治,2002,(1):13-16.
 [3] 林树钱.中国药用菌生产与产品开发[M].北京:中国农业出版社,2000.331-332.

[4] 林鹿,高等.[J].环境科学,1997,18(1):23-25.
 [5] Lopez M J, Elorrieta M A, et al.[J].Bioresource Technology,2002,81:123-129.
 [6] 冉艳红,于淑娟,杨连生,等.[J].微生物学通报,2003,2:32-36.
 [7] 冉艳红,于淑娟,杨连生,等.[J].华南理工大学学报,2003,3:40-44. ■