

# 金针菇在淀粉工业废水中发酵的生理生化特性

朱 辉<sup>1</sup>

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)<sup>1</sup>

何 国庆<sup>2</sup>

(浙江农业大学食品科技系 杭州 310029)<sup>2</sup>

**摘要** 以经液化处理的淀粉工业废水作金针菇液体深层发酵的培养基,研究发酵过程中菌球形态、生物量、pH、总糖、还原糖、氨态氮、糖化酶、蛋白酶的变化规律,描述了菌体的生长曲线,得到了菌丝体生长的动力学模型。第1~2d为延滞期,第3~8d为快速生长期,第8d后为衰老期。其中第3~6d菌丝体生长最为迅速、酶活力最高,基质消耗最快。发酵过程中pH呈上升趋势。对生理生化各因子之间的相互关系作了讨论。

**关键词** 淀粉废水,金针菇,发酵,生物量,生化特性

**分类号** Q936 TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0168-172

1998-04-21收稿,1998-11-16修回

# THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC IN *FLAMMULINA VELUTIPES* SING CULTURE UTILIZING STARCH PROCESSING WASTEWATER AS MEDIUM

Zhu Hui<sup>1</sup> He Guoqing<sup>2</sup>

(Biotechnology Institute, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)<sup>1</sup>

(Department of Food Science & Technology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)<sup>2</sup>

**Abstract** The liquefied starch processing wastewater was utilized as medium for submerged mycelia culture of *Flammulina velutipes*. The variation of mycelia pellets morphology, biomass, pH, total sugar, reducing sugar, ammonia nitrogen, amylase activity, protease activity was investigated during the process of fermentation. The growth curve for the mycelia of *Flammulina velutipes* is described and the growth kinetic model has been established. The growth curve showed a lag phase of approximately 2 days followed by a linear phase (the 3rd~8th days) when rapid growth took place, and then followed by a decline phase. During the 3rd~6th days, the speed of mycelia growth reached the top with the highest enzyme activity and speed of consuming the substrates. The pH value continued to increase during the incubation. The interaction among the physiological and biochemical factors is discussed.

**Key words** starch processing wastewater, *Flammulina velutipes*, fermentation, biomass, biochemical characteristic

目前,国内外对食用菌液体深层发酵过程中生理生化特别是酶活性变化的报道极为少见,使得人们对食用菌在液体深层发酵过程中的生理生化机制缺乏了解,这给发酵过程控制和营养条件研究带来了一定的困难。

已有报道证明利用淀粉工业废水来生产酵母菌、霉菌、细菌的单细胞蛋白(SCP)是减轻废水对环境的污染,使废弃资源重新利用的有效途径<sup>[1-3]</sup>。但由于上述 SCP 产品在生理功能上的一些缺陷,使其应用范围受到限制。同样作为一种菌体蛋白,食用菌菌丝体的营养结构更为合理,并解决了人们对其它菌体蛋白的安全性和口味的顾虑,应用范围更广。我们在此之前对金针菇和香菇在小麦淀粉工业废水中的生长适应性进行了研究,发现两者都能在淀粉废水培养基中生长,营养条件的改善可促进菌丝体的生长<sup>[4]</sup>。

本试验通过金针菇杂交 19 以淀粉废水为培养基发酵过程中的生理生化研究,探明发酵

过程中培养基的基质消耗、pH、菌体糖化酶活性、蛋白酶活性、菌丝球形态和生物量的变化规律,以揭示金针菇杂交 19 在淀粉废水培养基中的生理生化机制,为进一步研究发酵营养条件和发酵过程控制提供理论依据。

## 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(引自福建三明真菌研究所)。

**1.1.2 淀粉废水:** 杭州东南生化厂所采小麦淀粉废水, 淀粉含量 23.6mg/mL, 还原糖含量 0.9mg/mL, 蛋白质含量 2.6mg/mL, pH3.76。经液化处理后,测得还原糖含量为 9.7mg/mL, 总糖 26.0mg/mL。

**1.1.3 液体耐高温 $\alpha$ -淀粉酶:** 无锡酶制剂厂, 酶活单位 20000u/mL。

### 1.2 方法

**1.2.1 淀粉废水液化工艺:** 淀粉废水调 pH6.0,

加 $\alpha$ -淀粉酶 12u/mL,加热至液化完全<sup>[5]</sup>。

1.2.2 种子培养基: PDB 培养基。

1.2.3 摇瓶培养基: 液化后的淀粉废水, 加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mg/mL,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75mg/mL, 调 pH6.40,  $0.70 \times 10^5\text{Pa}$ , 灭菌 30min。

1.2.4 培养条件: 在 500mL 的三角瓶中装 100mL 培养液, 接种量 10%, 培养温度 25℃, 摇床转速 110r/min, 先静置 12h 后再开始旋转培养<sup>[4]</sup>。

1.2.5 取样方法: 每隔 24h 取样一次, 每个处理三个重复。

1.2.6 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。

1.2.7 总糖、还原糖、氨态氮、糖化酶活力、蛋白酶活力测定见《工业发酵分析》<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

接入菌液约 20h 后, 培养液中有小颗粒菌

丝球产生, 直径小于 1mm, 数量较少; 第 2~3d, 菌球数量明显增多, 菌球体积略有增大; 第 4d, 菌球数量大量增多, 体积增大, 发酵液开始由混浊转为澄清, 滤液呈淡黄色; 第 5d 时, 菌球表面出现明显的毛刺, 体积增大, 发酵滤液更加澄清, 颜色略为加深; 第 6d, 菌球体积继续增大, 达 2~3mm, 数量增加不多, 表面仍有明显的毛刺, 菌球已布满培养基, 滤液色度升高; 第 7d 时, 菌球表面毛刺开始老化, 滤液颜色略带棕色; 第 8d, 菌球表面部分毛刺消失, 滤液为棕色; 第 9~10d, 菌球表面光滑, 仅有少量不明显的毛刺, 菌球颜色加深, 滤液色度也逐渐升高。对发酵过程中培养基的基质消耗、pH 值、菌体糖化酶活性、蛋白酶活性、生物量进行测定, 结果如表 1。

### 2.1 生物量和 pH 变化

杂交 19 的生长曲线如图 1 所示, 大致可分为三个时期: 生长延滞期, 快速生长期, 衰退期。这与 Song, C.H. 在研究香菇深层发酵时的报道

表1 发酵过程中生理生化各因素的变化

发酵时间 (d)	生物量 (mg/mL)	总糖 (mg/mL)	还原糖 (mg/mL)	氨态氮 (mg/mL)	pH	糖化酶 (u/mL)	蛋白酶 (u/mL)
0	/	25.2	11.2	$8.19 \times 10^{-2}$	6.29	/	/
1	0.94	23.8	11.6	$5.12 \times 10^{-2}$	6.23	0.14	0.35
2	1.65	22.9	10.7	$4.78 \times 10^{-2}$	6.30	0.34	2.17
3	4.74	21.8	9.4	$2.05 \times 10^{-2}$	6.45	1.06	12.39
4	7.71	19.2	7.4	$13.7 \times 10^{-2}$	6.79	1.57	24.68
5	11.30	15.4	7.8	$41.0 \times 10^{-2}$	6.99	1.43	35.28
6	15.53	14.0	5.6	$47.8 \times 10^{-2}$	7.18	1.27	31.26
7	16.61	11.8	4.1	$52.1 \times 10^{-2}$	7.46	1.02	27.96
8	18.89	10.8	2.8	$58.0 \times 10^{-2}$	7.65	0.89	26.13
9	17.31	9.0	2.2	$75.1 \times 10^{-2}$	7.82	0.55	27.0
10	17.20	8.4	2.0	$81.9 \times 10^{-2}$	7.96	0.44	21.24

相似<sup>[7]</sup>。

第 1~2d, 为生长延滞期。菌种刚接到培养基后, 细胞内的各种酶系开始适应新的环境, 此时基质的消耗主要是用来合成一些酶, 生物量增加不明显。之后, 菌体数量逐渐增多, 进入快速牛长期(第 3~8d)。其中又以第 3~6d 生长最为迅速。此阶段, 各种酶的活性处于高峰期, 基质被迅速利用, 生物量呈算术级数增长,

达到生长高峰。第 7~8d, 生长速度减慢。第 8d 后, 进入衰退期。此时菌体逐渐老化, 基质利用速度下降, 酶活性降低, 生物量下降。因此, 以获取生物量为目的, 把发酵周期定为 8d 比较合适。

根据 Pirt 提出的丝状真菌在液体深层发酵过程中菌丝体生长的动力学模型<sup>[8]</sup>, 得到杂交 19 第 1~8d 菌丝体生长的动力学模型:

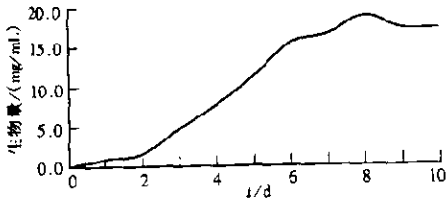


图1 杂交19的生长曲线

$$X^{1.1} = 0.8274 + 0.2542t \quad \text{相关系数 } r = 0.9747$$

X: 生物量(mg/mL), t: 培养时间(d).

pH除第1d略有下降外,以后都呈上升趋势。这跟菌种特性和培养基配比有关。由于菌体所含的酶系统形成和活性随时间而变化,因此对培养基中各种营养物质(如碳源和氮源)的利用次序和速率不一样。这些物质的代谢产物的生理酸碱性就表现为发酵过程中pH的变化。据报道,金针菇生长的适宜pH为4~7<sup>[9]</sup>,因此,有必要对发酵过程中的pH进行控制。

## 2.2 基质消耗

在发酵过程中,总糖始终都在下降。在快速生长期,特别在第4~5d,降糖速度最快。还原糖除第1d和第5d略有上升外,其余都呈下降趋势。在整个发酵过程中,还原糖的减少量占了总糖减少量的大部分,在初期甚至两者基本持平。这说明在培养初期,培养基中原有的还原糖被优先利用,糖化酶的影响极小;后来,糖化酶的活力有所提高,但还原糖产生的速度仍低于还原糖被利用的速度。

氨态氮含量反映了发酵过程中蛋白质的被利用情况。第1~4d氨态氮不断下降,第4d到达最低点,后来逐渐上升。氨态氮的变化跟菌体对蛋白质的利用程度、蛋白酶活力、菌龄有很大的关系。在发酵前期,菌体对蛋白质的需求量较大,氨态氮下降;后期,菌体对蛋白质的需求量下降,另外菌体自溶产生了部分氨态氮,使其含量上升。

## 2.3 糖化酶和蛋白酶活力

两者的走势都呈抛物线型。在整个发酵过程中,糖化酶的活力始终较低,第4d到达最高点,后逐渐下降。蛋白酶的活力在第1~2d较低,第2d后迅速上升,第5d到达最高点,之后

缓慢下降。两者的变化规律与生物量的变化大致相符,但呈现一定的超前性,酶活力高峰期也是菌体生长最旺盛的时期。后期酶活随菌体生长速度的下降和pH的上升而下降。

## 3 讨论

### 3.1 生理生化诸因素之间的关系

在发酵初期,菌体的酶系需适应新的环境,酶活表现较低,代谢相对较弱。随着菌体的增多,糖化酶和蛋白酶的活性增强,基质消耗增大,生长速度加快。

进入快速生长期后,菌体的代谢更加旺盛,对基质的需求量不断增大,总糖、还原糖、氨态氮不断下降,生物量呈算术式增长。同时,两种酶的活性进一步增强,分别在第4d和第5d达到最高点,这是生长最旺盛的时期,总糖的下降幅度达到最大,还原糖含量出现了升高现象,说明糖化酶产生糖的速度已经超过了菌体利用糖的速度。在此之前,菌体对蛋白质的需求量较大,而蛋白酶分解蛋白质的速度不能满足菌体的需求,因此氨态氮持续下降;第5d时pH为7.0左右,是蛋白酶作用的最适pH,蛋白酶活性到达最高点,氨态氮开始回升。之后,随着pH的继续上升,菌体的生长速度减慢,对基质需求量和两种酶的活力都逐渐下降。

进入衰退期后,虽然生物量下降,但总糖和还原糖仍呈下降趋势。这是由于菌丝体的生长是一个相对的过程,它包括菌球外围的生长和菌体内部由于缺氧引起的自溶。在发酵后期,自溶占了优势,使生物量下降。菌球外围进行的生命活动仍要消耗一部分的营养,因此糖含量继续下降。后期菌体自溶产生的 $\text{NH}_4^+$ 更进一步促进了pH的上升。

### 3.2 淀粉废水培养基进行营养调整的必要性

以8d作为发酵周期,发酵结束时,残糖尚达10.8mg/mL,糖的利用率仅为56%左右,整个发酵过程中糖化酶的活力也比较低。这可能是由于菌体对糖的利用机制受到阻抑,使一部分糖得不到利用,从而对菌体的生长造成了影响。推测pH的过度上升与菌体对碳源和氮源

不同的利用速率有关,可能是菌体对糖的利用机制受阻抑,使氮类被优先利用导致 pH 上升。从表 1 可见,杂交 19 的生长最适 pH 在 6.3~7.2 之间,过高的 pH 会影响菌体的生长。本试验所用的淀粉废水的碳氮比为 23:1,在金针菇生长的最适碳氮比 20~30:1 的范围内<sup>[9]</sup>。可能是在金针菇生长代谢特别是碳代谢中起作用的一些离子和生长因子的缺乏,使得菌体的代谢机制受到影响。如在培养基中对此进行调整,就极有可能改善菌体的生长。

### 参 考 文 献

[1] 尹源明,何国庆,冯澜等. 中国粮油学报,1998,13(1): 36~40.

- [2] Jamuna R. J Ferment Bioeng, 1989, 67(2):126~131.
- [3] Manilal V. B. J Microbiol Biotechnol, 1991, 7(2): 185~190.
- [4] 朱辉,何国庆,尹源明. 浙江农业大学学报,1997, 23(6):659~662.
- [5] 何国庆,朱辉,陈忠明等. 浙江农业学报,1997,9(5): 235~239.
- [6] 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.
- [7] Song C H, K Y Cho. Mycology, 1987, 79(6):866~876.
- [8] Pirt S. J. Proc. Roy Soc. Ser. B. Biol. Sci. 1966, 166(1004):369~373.
- [9] 黄年来主编. 自修食用菌学,南京:南京大学出版社, 1987, 76, 109.