

应用气升式反应器培养草酸青霉菌菌丝球的研究

袁丽梅^{1,2} 张书军¹ 杨 敏^{1*} 杨清香¹ 章丽萍²

(¹ 中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

(² 中国矿业大学化工与环境工程学院 北京 100083)

摘 要 应用 0.5L 气升式反应器成功实现了对高效染料吸附丝状真菌——草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*)的颗粒化,初步解决了菌体与培养液分离的问题。以 OD_{600} 为 0.23 的孢子悬浊液接种时,菌丝成球的最佳接种量为 2.5%,最佳通气量为 0.5L/min。菌球直径及沉降速度随时间均呈线性增长。在最佳接种量(2.5%)和最佳通气量(0.5L/min)下 30℃ 培养 72h 后,菌球的直径和沉降速度分别为 (4.0 ± 0.8) mm 和 (14 ± 3) mm/s。

关键词 菌丝球,气升式反应器,青霉菌,吸附

中图分类号:Q93-335 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0393-03

合成染料广泛用于印刷、染整、食品等行业,超过 10% 的染料在使用过程进入水体^[1]。它们通常结构稳定,耐光解、耐氧化、耐生物降解,处理难度很大^[2]。我国是世界上最大的染料生产和消费国,大量的染料废水亟待有效处理。近年来一些研究发现,丝状真菌可以快速、高效地吸附水中的染料,吸附在菌体上的染料通过适当的溶剂还可回收^[3,4]。因而应用丝状真菌吸附法处理染料废水的研究在国内外受到广泛关注。

但在液体培养时,丝状真菌的菌体常以分散状的菌丝存在,这不仅大大增加了培养液的粘度,不利于传质和传热,也使菌体与培养液难分离^[5]。本研究组筛选到了一株丝状真菌——草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*),它对多种染料都有很好的吸附去除效果,有望作为染料吸附剂处理染料废水^[6,7]。进一步研究表明,此菌摇床培养时,在合适的条件下可以生成致密的易沉降的菌球,该特性有利于菌体回收以及废水处理过程中的固液分离。关于菌丝成球已有大量文献报道^[8-10],但至今为止,在反应器中大量生产致密菌球仍然主要依赖于经验。

气升式反应器以其结构简单、无机械搅拌、剪切力低等优点在丝状真菌的培养中受到广泛关注^[11]。然而,反应器结构、接种量、通气量、菌的种类等因素都会影响菌体的形态^[12]。本研究考察了在气升式反应器中接种量和通气量对 *Penicillium oxalicum* 生长及形态的影响,旨在选出菌体成球的最优条件,为放大培养提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

该丝状真菌自某染料厂周围的土壤中筛得,经中国科学

院微生物所鉴定为草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum* Currie & Thom),保藏号为 CGMCC No. 0810。

1.2 培养基(改进的马丁氏培养基)

每升培养基含 10g 葡萄糖,1g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g KH_2PO_4 , 琼脂 20g(用于液体菌种培养时不加琼脂), pH 5.2。

1.3 接种

取出 4℃ 保存的青霉菌孢子,活化 24h,加灭菌的去离子水制成孢子悬浊液(OD_{600} 为 0.23)。

1.4 分析方法

1.4.1 还原糖:采用 DNS 法^[13]。

1.4.2 总氮(TN):采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法^[14]。

1.4.3 总磷(TP):采用钼锑抗分光光度法^[14]。

1.4.4 菌球直径:用带标尺的显微镜观察测定。以同批次随机取得的 10 个菌球直径的算术平均值作为该时刻菌球的直径。

1.4.5 沉降速度:在不同培养阶段自反应器中随机取一定数目的菌丝球,分别加入盛有 1100mL 蒸馏水的 1L 量筒中,用秒表测其沉降一定高度所需的时间,以沉降高度除以相应的沉降时间即得沉降速度。以同次随机取得的 10 个菌球沉降速度的算术平均值作为该时刻菌球的沉降速度。

2 实验装置和操作

2.1 实验装置

以 0.5L 的玻璃气升式反应器培养该真菌(图 1)。内管高 29.0cm,内管内径 3.8cm;外管高 37.0cm,内径 4.5cm。用循环的恒温水保持反应液的温度为 30℃。

基金项目:国际合作项目,受日本国土环境株式会社资助

* 通讯作者。Tel: 86-10-62923475; E-mail: yangmin@mail.rcees.ac.cn

作者简介:袁丽梅(1978-),女,黑龙江人,硕士研究生,主要从事环境生物学方面的研究。E-mail: lmmmyuan@163.com

收稿日期:2003-07-17,修回日期:2003-11-21

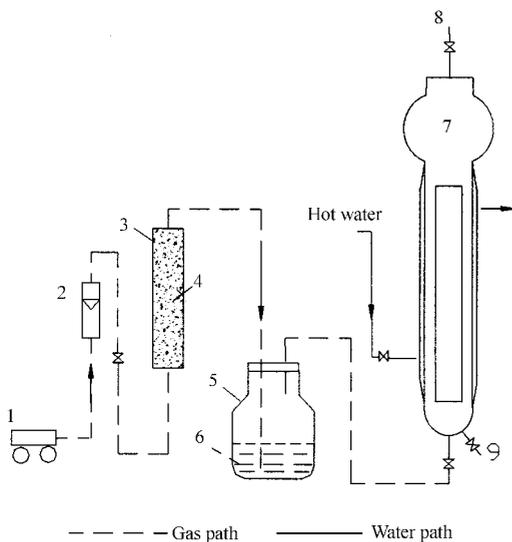


图1 菌丝球培养装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus for mycelial pellets cultivation
1. Air compressor; 2. Flowmeter; 3. Cotton filter; 4. Cotton; 5. Wetting filter; 6. Sterile water; 7. Airlift reactor; 8. Sampling orifice; 9. Liquor drainage.

2.2 反应器灭菌

先用铬酸洗液清洗1次,再用75%的酒精浸泡12h,最后用无菌水清洗两次。

2.3 棉炭过滤器灭菌

将过滤器放入干燥箱中,在160℃下灭菌60min,冷却后取出,在无菌条件下迅速连接好管道。

2.4 接种量影响

将 OD_{600} 为0.23的接种液加入反应器内,补充培养液至450mL,接种量以体积比计分别为0.25%、2.5%和12.5%。通气量为0.5L/min,培养时间72h。

2.5 通气量影响

在接种量为2.5%条件下,考察了气量分别为0.2L/min、0.5L/min及1.0L/min时菌的生长情况,培养时间72h。对应于各气量的反应器内管表面气速分别为2.9mm/s、7.4mm/s和14.7mm/s。

3 结果和讨论

3.1 接种量的影响

接种量对菌的形态有很大的影响。当接种量为0.25%时,菌球大而疏松,且菌量很少,菌球由于直径过大而滞留在气升式反应器的内外筒壁之间。接种量为12.5%时,菌体大量生长,但菌球很小,同时有大量的菌丝存在,培养液呈粥状,菌体与水很难分离。接种量为2.5%时,菌体可以成均匀而致密的菌球,且菌体生长量大。三者比较,2.5%为菌球形成的最佳接种量。

从基质消耗情况看,接种量越大基质消耗越快。如图2所示,接种量为12.5%时,总氮在41h就基本被耗尽,接种量为2.5%和0.25%时这一时间分别为62h和72h。葡萄糖的消耗与总氮类似,接种量为12.5%的培养液在56h时糖被耗

尽,接种量为2.5%时葡萄糖的耗尽时间为72h,接种量为0.25%时所需时间更长。

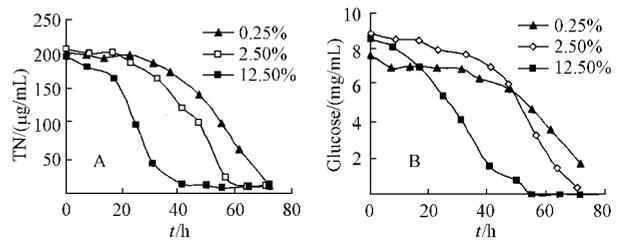


图2 不同接种量下反应器内各基质的变化

Fig. 2 Variations of TN (A) and glucose (B) during cultivation under different inoculum ratios

3.2 通气量的影响

当气量为1.0L/min时,培养液浑浊,有大量菌丝存在,菌体难沉降。这可能是剪切力太大,大量菌丝被剪短所致。当气量为0.2L/min时,培养液澄清,菌球沉降较快,但培养结束时菌球间相互交联,形状不规则,大量的菌体贴反应器壁生长,不利于菌体的收集。而气量为0.5L/min时,可同时克服大气量时无法成球和小气量时菌体贴壁生长的缺点,所得菌球形状均匀规则,沉降快速。三者比较,气量0.5L/min为菌球形成的最佳气量。

气量对基质的代谢也有明显的影响(图3)。当气量增大时,TN和糖的消耗速率都增加,这可能是气量增大时,氧的浓度增加,菌的生长加快的结果。

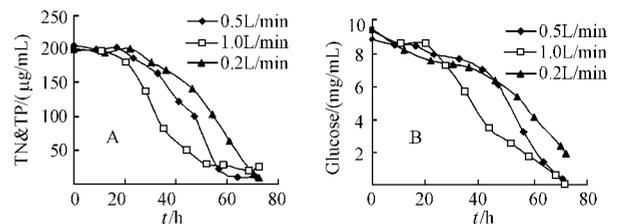


图3 不同气量下反应器内各基质的变化

Fig. 3 Variations of TN (A) and glucose (B) during cultivation under different air feeding rates

3.3 最佳培养条件下菌的生长特性

在最佳接种量(2.5%)和最佳通气量(0.5L/min)下,考察了菌球直径及沉降速率随时间的变化。由图4可以看出,菌球直径和沉降速度随时间呈近似线性增长。72h时菌球的直径增至4.0mm左右,沉降速度增至14mm/s左右。进一步研究表明,当培养时间超过72h时,菌球开始变黄,培养液开始变浑浊,这可能是基质消耗完全,菌体开始老化的缘故。基质的pH在16~40h内由3.9降至2.6,但即使在pH低于2.6后菌球直径仍保持线性增加。在低pH值时糖、氮及磷的代谢也没有受到明显的影响,表明该菌可以在较广的pH范围内生长。

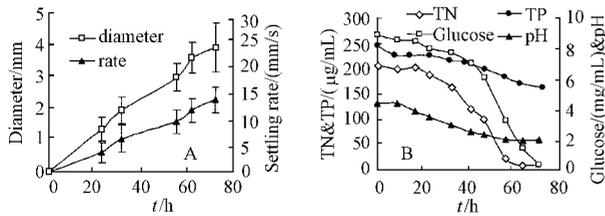


图4 菌球直径、沉降速率及基质随时间的变化

Fig.4 Variations of several parameters during cultivation under optimum conditions

4 结论

本试验结果证明该青霉菌在气升式反应器内可以生成致密的可快速沉降的菌丝球,从而解决了菌体与水分离的问题。接种量和通气量对菌的成球有很大的影响,最佳接种量为2.5%,最佳通气量为0.5L/min。

菌球的直径和沉降速度随时间均呈线性增长。实现菌丝的颗粒化是该青霉菌用于实际染料废水处理的关键。本研究表明该菌在气升式反应器内可以形成球状颗粒,将来的研究将集中在反应器的放大和菌球的连续培养上。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Yu J. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Wat Sci Tech*, 1998, **38**(4 ~ 5): 233 - 238.
- [2] Mahony T O, Guibal E, Tobin J M. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**: 456 - 463.
- [3] Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Biores Tech*, 2001, **79**: 258 - 262.
- [4] Chen J, Wu C. Desorption of dye from a activated carbon beds: effect of temperature, pH, and alcohol. *Wat Res*, 2001, **35**(17): 4159 - 4165.
- [5] Moreira M T, Sanromán A, Feijoo G, et al. Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. Application to *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Tech*, 1996, **19**: 261 - 266.
- [6] Zhang S J, Yang M, Yang Q X, et al. Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotech Lett*, 2003, **25**: 1479 - 1482.
- [7] 张书军, 杨敏, 辛宝平, 等. 应用青霉菌 BX1 活体吸附水中活性艳蓝 KN-R. *环境科学*, 2004, **25**(1): 62 - 65.
- [8] Yin P, Yahiro K, Ishigaki T, et al. L-Lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85**(1): 96 - 100.
- [9] Leah E. A model for pellet size distributions in submerged mycelial cultures. *J Theor Biol*, 1983, **105**: 427 - 452.
- [10] Suijdam J C V, Hols H, Kossen N W F. Unstructured model for growth of mycelial pellets in submerged cultures. *Biotech Bioeng*, 1982, **24**: 177 - 191.
- [11] Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, et al. Production of ϵ -polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *J Biosci Bioeng*, 2002, **93**(3): 274 - 280.
- [12] Allen D G, Robinson C W. Hydrodynamics and mass transfer in *A. niger* fermentations in bubble column and loop bioreactors. *Biotech Bioeng*, 1989, **34**: 731 - 740.
- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426 - 428.
- [14] Eaton A D, Clesceri L S, Greenberg A E. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. APHA, 1995.

Study on Producing Mycelium Pellets of *Penicillium oxalicum* in An Airlift Reactor

YUAN Li-Mei^{1, 2} ZHANG Shu-Jun¹ YANG Min^{1*} YANG Qing-Xiang¹ ZHANG Li-Ping²

(¹ Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(² China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: The mycelium pellets of high-performance dye-adsorbing filamentous fungus, *Penicillium oxalicum* were successfully produced in a 0.5L airlift reactor. The pellets were compact and could settle rapidly, which facilitate the recovery of the pellets from culture. The optimal inoculum was 2.5% and the optimal air rate was 0.5L/min under a spore inoculum OD_{600} of 0.23. Both diameters and settling rates of the pellets increased linearly with the increase of culture time. The diameter and settling rate of the pellets in de-ionized water were (4.0 ± 0.8) mm and (14 ± 3) mm/s, respectively, following culture in the optimal conditions (inoculum: 2.5%; air rate: 0.5L/min, 30°C) for 72h.

Key words: Mycelium pellets, Airlift reactor, *Penicillium oxalicum*, Adsorption

Foundation item: International Cooperative Project Sponsored by Japan Territorial Environment Association

* Corresponding author. Tel: 86-10-62923475; E-mail: yangmin@mail.reces.ac.cn

Received date: 07-17-2003