# 红薯淀粉废水发酵类球红细菌条件优化

韩庆莉1,2，赵志瑞2，周永双3， 白志辉2\*

（1. 西南林业大学，昆明 650224；2. 中国科学院生态环境研究中心，北京 10085；3. 江南大学食品学院，无锡 ）

摘 要：类球红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*）作为微生态制剂的生产菌种之一，具有广泛的应用价值。红薯淀粉废水是不含有毒物质的高浓度有机废水，在不外加任何营养物质的情况下，能够提供类球红细菌生长所需的营养物质。单因素实验表明，培养因素中红薯废水的浓度、pH和温度为主要影响因子。正交试验优化后最佳培养条件为：红薯淀粉废水稀释度60%，pH值7.0、温度35℃、光照300 LX、接种量7.5%、转速200 r/min，此条件下，24 h类球红细菌浓度达到6.7×109 CFU/mL，与LB培养液（6.9×109 CFU/mL）无显著差异，表明用红薯淀粉废水发酵类球红细菌具有可行性。

关键词：红薯淀粉废水，类球红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*），培养条件优化

**Optimization of fermentation conditions for *Rhodobacter sphaeroides* by sweet potato starch wastewater**

**HAN Qing-li1,2, ZHAO Zhi-rui2, ZHOU Yong-shuang3, BAI Zhi-hui2\***

（1.Southwest Forestry University, Kuiming 650224,China; 2. Research Center for Eco-envirtmental Sciences,Chinese of Sciense,Beijing 10085,China; 3. The School of Food Science and Technology of Jiangnan University, Wuxi 214112, China）

**Abstract**: As one of probiotics strains, *Rhodobacter sphaeroides* has extensive application value. Sweet potato starch wastewater is high concentration organic wastewater wihtout toxic substances and can provides nutrients what *Rhodobacter sphaeroides* growth needed without adding other nutrients. Single factor experiment shows that the concentration, pH and temperature of sweet potato wastewater are the main influence factors. Orthogonal experiment shows the optimum culture conditions of *Rhodobacter sphaeroides*: the wastewater was diluted to 60%, pH 7.0, temperature 35℃, illumination 300 LX, inoculum 7.5%, rotate speed 200 r/min. After 24 h cultivation, *Rhodobacter sphaeroides* cells reached to 6.7×109 CFU/mL, which showed no significant difference comparing to LB culture medium. Result Indicates it is feasible to ferment *Rhodobacter sphaeroides* using sweet potato starch wastewater.

**Keywords:** sweet potato starch wastewater, *Rhodobacter sphaeroides*

淀粉是一种重要的工业原料，在其生产过程中，废水的排放量很大，每生产1吨淀粉就要产生10~20吨废水[1]。红薯淀粉废水是以鲜红薯或红薯干为原料，采用酸沉淀法生产淀粉时产生的废水，其COD值高达10000 mg/L以上，BOD5值约为4500 mg/L，可生化性很好，含有溶解性淀粉、可溶性蛋白质、多糖、氨基酸、果胶、有机酸、少量的油脂、维生素以及无机盐等多种有机和无机物质，是不含有毒物质的高浓度有机废水[2,3]，直接排放不仅浪费了宝贵的资源，而且造成水体的富营养化，导致水体污染，处理不当极易腐败发酵，使水质发黑发臭，造成严重的环境污染。)

类球红细菌（*Rhodobacter Sphaeroides*）属于紫色非硫光合细菌， 菌体内含有丰富的色素，能进行光合作用。自上世纪80年代已来，以光合细菌为主要活性菌的PSB法，被应用于多种高浓度有机废水处理，并逐步认识其菌体的营养价值和一些特殊的生理活性，被广泛应用在水产养殖中，作为兼有净化水质、促进生长、减少发病的微生物添加剂[4]。近年来国外学者发现一些类球红细菌的活性菌种的细胞壁脂多糖中含有一些特殊成分，如3－羟基癸2酸、二磷酸类脂质A类，不但没有毒性，而且对一些由细菌内毒素引发的机体毒性反应，有显著的拮抗作用，对抑制性Ts细胞有灭活功能，从而发挥对机体免疫调节作用[5,6]。国内也报道了类球红细菌抗肿瘤、抗脂质过氧化、抗辐射等功能，并开发了相应的保健品[7]。

类球红细菌作为微生态制剂的生产菌种之一，是一种可以进行自身光合作用的非致病菌，在满足光照条件，密闭厌氧，培养基有碳源、氮源、基本的微量元素等条件下就可以快速的生长繁殖[8,9]。从理论上分析，红薯淀粉废水中的蛋白质、果胶、糖类、纤维素等有机质是微生物生长的良好营养底物，可以做成微生物培养基培养类球红细菌，这样不仅可以解决红薯淀粉废水处理能耗高，费用大的问题，而且大大降低了类球红细菌大量生产的原料成本，有利于推广应用。针对红薯淀粉废水中含有丰富的营养物质，本文研究了红薯淀粉废水的稀释浓度、pH值、温度、接种量、光照强度等因素对类球红细菌生长的影响，并优化这此影响因子，为进一步用红薯废水规模化发酵类球红细菌提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1红薯淀粉废水及水质测定

红薯淀粉废水：300 g红薯去皮，切块，加1000 mL水，榨汁，过滤去渣，加水补足1000 mL，静置沉淀2 h后去除淀粉，倒出上清，即为红薯淀粉废水。

酸度计测红薯废水pH值；固形物测定：取20 ml静置去除淀粉的原液，放烘箱80℃烘干至恒重，称重，三次重复；总糖和还原糖的测定：3,5-二硝基水杨酸比色法；COD测定：WXJ-20型微波密封消解COD化学需氧量分析仪；氨氮的测定：PNH3-1型氨电极法；总氮测定：克氏定氮法。

### 1.2红薯淀粉废水培养类球红细菌单因素试验

分别在红薯淀粉废水的不同稀释浓度（自来水稀释红薯淀粉废水，用红薯淀粉废水原液体积含量%表示稀释后红薯淀粉废水浓度）、不同初始pH（用2M的HCl和2M的NaOH调pH）、不同温度、不同接种量、不同光照强度下培养类球红细菌。每个因素均用250 mL三角瓶装红薯淀粉废水培养液100 mL，3次重复，200 r/min摇床培养，24 h取样，用平板计数法测定类球红细菌菌落数。

### 1.3红薯淀粉废水培养类球红细菌单因素正交优化试验

在单因素实验结果上选择几个主要影响因素来研究对类球红细菌生长，各因素选择3水平进行试验。

## 2结果与分析

### 2.1红薯废水水质性质

红薯淀粉废水的主要理化指标：pH为6.7~6.9，COD为227000 mg/L，NH3-N为2630 mg/L，还原糖为6550 mg/L，总糖为10300 mg/L，固形物18.7 mg/L。

由结果可知，实验室自制的红薯废水是一种高浓度有机废水，含有微生物所需的基本营养物质，除pH比工厂实际红薯淀粉废水（pH为4~5）高外，COD和高含糖量及高的氨氮量的特点和工厂红薯淀粉废水具有相似。

### 2.2 红薯废水发酵类球红细菌单因素影响

#### 2.2.1红薯淀粉废水不同稀释浓度的影响

图1.1显示出类球红细菌对不同浓度的红薯淀粉废水的适应能力（pH 7.2，32℃，光照200 LX，200 r/min，接种量5%）

图 1.1 不同浓度红薯淀粉废水培养类球红细菌

Figure 1.1 The Colonies number of *Rhodobacter sphaeroies* in different concentration of sweet potato starch wastewater

结果表明，稀释度为60%的红薯废水中类球红细菌生长量最高，与LB培养基（6.1×109 CFU/mL）无显著差异。随着稀释倍数的增加，红薯淀粉废水中营养物质的浓度逐渐下降，水分活度逐渐上升，类球红细菌的生长量先上升后下降。100%、80%、60%、50%的红薯废水，24 h的类球红细菌数相互之间有显著差异（p<0.05）。60%稀释度下红薯淀粉废水的水分活度适宜类球红细菌的生长，且营养物质可满足其生长繁殖，类球红细菌的生长量最高，为最佳稀释度。

#### 2.2.2不同初始pH值的影响

不同初始pH的红薯淀粉废水培养类球红细菌生长情况如图1.2所示（稀释度为60%，32℃，光照200 LX，200 r/min，接种量5%）

图 1.2不同初始pH下红薯淀粉废水中培养类球红细菌

Figure 1.2 The Colonies number of *Rhodobacter sphaeroies* in sweet potato starch wastewater undrer different pH

结果表明，pH对类球红细菌在红薯淀粉废水是生长是一重要的影响因素，最适pH 6.9~7.6（菌体浓度5.2~5.8×109 CFU/mL）。而在小于6.9和大于7.6的pH下菌体浓度显著降低（3.1~3.8×109 CFU/mL）。另外还测得，培养24 h的红薯淀粉废水pH都有所回升，这主要是类球红细菌培养过程中一方面利用了废水中的残留有机酸，另一方面类球红细菌将废水中残留氨基酸分解释放的氨造成pH回升。

#### 2.2.3不同培养温度的影响

不同温度下，红薯淀粉废水培养24 h时类球红细菌生长情况如图1.3所示（稀释度为60%，pH 7.0，光照200 LX，200 r/min，接种量5%）。

图1.3 不同温度下红薯淀粉废水的培养类球红细菌

Figure 1.3 The Colonies number of *Rhodobacter sphaeroies* in sweet potato starch wastewater undrer different temperature

结果表明，20℃~30℃内，类球红细菌生长量无显著差异，35℃~45℃内类球红细菌生长量无显著差异，而35℃ 菌体生长量（6.8×109 CFU/mL）显著高于30℃（6.0×109 CFU/mL），从经济的角度出发，35℃为最佳温度。

#### 2.2.4不同接种量的影响

不同接种量下，红薯淀粉废水培养类球红细菌生长情况如图5.4所示（稀释度为60%，pH 7.0、35℃，光照200 LX）。

图1.4 不同接种量下红薯淀粉废水的培养类球红细菌

Figure 1.4 The Colonies number of *Rhodobacter sphaeroies* in sweet potato starch wastewater undrer different inoculumconcentration

接种量为7.5%时，类球红细菌的生长量显著高于2.5%和5%，但是接种量在7.5%和15%之间，菌体生长量无显著差异，表明接种量大于7.5%时，菌体在红薯淀粉废水中的生长迅速，短时间内就可消除接种量带来的差异。

#### 2.2.5不同光照强度的影响

不同光照强度下，红薯淀粉废水培养类球红细菌生长情况如图2.5所示（稀释度为60%，PH 7.0，35℃，接种量7.5%，200 r/min）。

图1.5 不同光照强度下红薯淀粉废水的培养类球红细菌

Figure 1.5 The Colonies number of *Rhodobacter sphaeroies* in sweet potato starch wastewater undrer different illumination intensity

结果表明，类球红细菌既可以在光照条件下生长又可以在避光条件下生长，光照强度200 LX、250 LX、350 LX和避光下培养无显著差异，但300 LX菌体浓度显著高于200 LX和避光。总体来讲，光照对红薯淀粉废水发酵培养类球红细菌的影响不大。

### 2.3红薯淀粉废水发酵类球红细菌最佳优化条件

由单因素实验可知，红薯淀粉废水的稀释倍数、pH值、温度为发酵类球红细菌的重要影响因素，三因素取三水平，正交试验单因素水平和结果见表1.1、1.2、1.3所示。

表1.1 实验因素及水平

Table 1.1 Factors and levels for orthogonal test

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **水 平** | **因 素** | | |
| A．(温度℃) | B．(pH值) | C．(稀释浓度%) |
| 水平1 | 25 | 6.5 | 50 |
| 水平2 | 30 | 7.0 | 60 |
| 水平3 | 35 | 7.5 | 70 |

表1.2 正交试验结果

Table 1.2 The result of orthogonal test

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **实验分组** | **A温度/(℃)** | **B pH值** | **C稀释浓度（%）** | **菌体浓度（109 CFU/mL）** |
| 1 | 25 | 6.5 | 50 | 5.2 |
| 2 | 25 | 7.0 | 60 | 6.3 |
| 3 | 25 | 7.5 | 70 | 5.6 |
| 4 | 30 | 6.5 | 50 | 5.4 |
| 5 | 30 | 7.0 | 70 | 6.1 |
| 6 | 30 | 7.5 | 60 | 5.9 |
| 7 | 35 | 6.5 | 70 | 5.7 |
| 8 | 35 | 7.0 | 60 | 6.7 |
| 9 | 35 | 7.5 | 50 | 6.3 |

表1.3 生物量直观分析

Table 1.3 The analysis of biomass

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **生物量** | **A．温度/(℃)** | **B．pH值** | **C．稀释倍数** |
| 1 | 5.7 | 5.5 | 5.6 |
| 2 | 6.0 | 6.3 | 6.3 |
| 3 | 6.2 | 5.9 | 5.8 |
| R | 0.5 | 0.8 | 0.7 |

红薯淀粉废水稀释度、pH和温度三因素都取三水平，实验共分为9组，从1.3可得，稀释度60%、温度35℃、pH值7.0的实验组类球红细菌的生长显著高于其它组，24 h的浓度达到6.7×109 CFU/mL。

表1.3中均值i为表1.2中对应列的i水平的生物量，i值越大，表明在该水平下的处理效果越好，极差R的大小反映了因素取不同水平所引起指标的变化大小。极差大说明该因素对指标的影响比较大，极差小就意味这该因素对指标的影响比较小。根据极差的大小，可判断出，红薯淀粉废水pH和稀释浓度对培养类球红细菌的因响大，培养温度的影响相对较小。

类球红细菌在优化后最佳发酵条件下的生长曲线如图1.6所示（稀释度60%，pH值7.0，35℃，光照300 LX，接种量7.5%，200 r/min）



图1.6 最佳优化条件下类球红细菌生长曲线

Figure 5.6 The growth curve of *Rhodobacter sphaeroies* in sweet potato starch wastewater undrer optimum condition

类球红细菌在优化发酵因素后的红薯淀粉废水中，15 h后进入对数生长期，24 h菌液浓度达到最高（6.7×109CFU/mL），从图可见，优化后的红薯淀粉废水发酵类球红细菌接近用LB发酵效果，具用很强的实际应用性。

## 3讨论

类球红细菌的生长繁殖以多种营养物为基础，同时也受各种环境因素的影响，如温度、酸碱度(pH)、氧气、有毒物质等。

培养液中的有机质和无机盐的含量一方面为微生物提供生长所必需的物质，另一方面也影响着培养液中水对微生物的渗透压，从而影响微生物的生长和繁殖。红薯淀粉废水浓度过高，引起水的活度降低，造成高的渗透压，浓度过低，反之渗透压小，渗透偏大或偏小都不利于类球红细菌对水分和营养物质的吸收，从而影响菌体的生长和繁殖。另外，高浓度红薯废水中的高糖和氨氮对微生物产生一定的抑制作用；稀释浓度过低时，红薯废水中的营养过低，不能满足类球红细菌生长的营养需求。

环境pH与类球红细菌的生命活动密切相关，它不但可影响到细胞膜所带的电荷，引起细胞对营养物的吸收状况发生改变，而且可以改变某些化合物进入细胞的状态，从而促进或抑制细胞的生长。另外，环境的pH还影响类球红细菌代谢过程中的酶的活性。光合细菌生长pH范围为5~9，在pH值低于5和高于9的培养液中，光合细菌生长受到抑制，菌液发黄，细胞沉淀，最终死亡。

温度通过影响微生物细胞膜的液晶结构，酶和蛋白质的合成和活性，以及RNA的结构及转录等来影响微生物的生命活动。类球红细菌的生长温度比较广，其生长的温度范围一般为20~40℃。类球红细菌在废水处理中的适应温度为25~30℃[10]。同一菌种的不同菌株或不同菌龄的细胞对热的耐受力不同，一般幼龄菌比老龄菌对热敏感。

本实验结果表明，光照强度对红薯淀粉废水培养类球红细菌影响不大，这是因为类球红细菌具有广泛的代谢方式，而且在厌氧、好氧、黑暗、光照条件下都能较好地利用低级脂肪酸、氨基酸和糖类等。

碳源、氮源、无机盐是类球红细菌生长所必需的营养物质，本文用红薯淀粉废水培养类球红细菌的实验中没有外加任何碳源、氮源和无机盐，对废水的浓度、pH、温度、光照、接种量优化后，类球红细菌菌体的生长量就可达到LB培养液中的生长量，因此可见，红薯淀粉废水是一种非常好的培养类球红细菌的原料。

# 参考文献

[1] 李琳，张清敏，杨建华. 复合微生物絮凝处理红薯淀粉废水的研究[J]. 环境科学，技术，2006，**29** (7): 75-76.

[2] 褚华宁. UASB 处理红薯淀粉废水的关键技术研究[D].河北工业大学，2006.

[3] 李生，李健，邵振卿等. 利用气浮- UASB-SBR 工艺处理红薯淀粉废水[J].周口师范学院学报，2006，**23** (9): 83-85.

[4] Eroglu E, Eroglu I,Gunduz U, *et al*. Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater[J]. Bioresource Technology, 2008, **99**(15): 6799-6808.

[5] Baker P J, Taylor C E, Stashak P W, *et al*. Inactivation of suppressor T cell activity by the nontoxic lipopolysaccharide of *Rhodobacter Sphaeroides*[J]. Infection and Immunity, 1990, **58**(9): 2862-2868.

[6] Tagie P J, Ouinn J J，Qureshi N, *et al.*Grain dust induced inflammation is reduced Rhodobacter Sphaeroides diphosphory-lipid[J]．American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1998, **274**(l): 26-31.

[7] 刘倥清，王梦亮，齐延兵等. [康强硒](http://www.cqvip.com/content/citation.dll?id=2512984&SUID=BE1810AF042FEF01758D149B46488301)(CONSE)对恶性胂瘤辅助治疗的临床观察[J]．山西医科大学学报，1997，**28**(1) : 48-50.

[8] 张信娣,史永军，陈银科等. 光合细菌和有机肥对土壤主要微生物类群的影响[J].中国土壤与肥料，2007，(3): 59-62..

[9] 陈克，杜国营，冯冰等. 光合细菌在蔬菜栽培及废水处理中的应用[J].农业，技术，2005，**25** (6): 106-110.

[10] Zhu H, Fang H H P, Zhang T, *et al*. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, **32** (17): 4112-4118.

# 作者简介

韩庆莉：女，西安人，1975年12月生，博士，讲师，主要丛事微生物农药和农药残留生态效应研究。E-mail: [hanqingli1103@163.com](mailto:hanqingli1103@163.com) <Tel:13320505255>

通讯作者：白志辉， E-mail: [zhbai@rcees.ac.cn](mailto:zhbai@rcees.ac.cn) Tel:13146591232

文章基金：国家自然科学基金（30600082）