

Production of Microbial Flocculant Using Soybean Curb Residue as Sole Substrate and Its Application in Defecating the Trona Suspension

Zhanying Liu, Yanying Chen, Jingran Yu, Tao Wang, Jianbin Zhang, Tong Zhang*, Dongyan Zhang

College of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051

Email: liuzy1979@yeah.net, tongz@imut.edu.cn

Abstract: In trona industry, microbial flocculant is much safer and environmentally friendlier than conventional chemically synthesized flocculants. In previous study, a strain of *Klebsiella pneumoniae* was isolated and identified. The strain has a high flocculation rate to trona suspension which is strong alkaline and contain complex ingredients. In the paper, to reduce the production cost of microbial flocculant, soybean curb residue is selected from various wastewater and waste residues as sole ingredient of culture medium. Culture conditions are optimized when soybean curb residue is used as sole substrate. The optimal conditions for the production of microbial flocculant are the concentration of soybean curb residue 200 g/L, initial pH 8.0, cultivating temperature 30°C, and shaking speed 160 r/min, under which the flocculation rate reaches 80%-84% without addition of additional carbon source and nitrogen source. The component analysis of soybean curb residue shows the nutrition ingredients in soybean curb residue satisfy the production of microbial flocculant. The paper also provides a guide for the application of soybean curb residue in other fermentation.

Keywords: microbial flocculant; trona suspension; cost-effective medium; soybean curb residue

利用豆腐渣生产天然碱碱泥用微生物絮凝剂

刘占英, 陈雁鹰, 余靖冉, 王 韬, 张建斌, 张 通*, 张冬艳

内蒙古工业大学, 呼和浩特市, 中国, 010051

Email: liuzy1979@yeah.net, & tongz@imut.edu.cn

摘 要: 在天然碱生产中, 利用微生物絮凝剂絮凝天然碱碱泥, 具有安全无毒、环保等优点。在前期研究中分离鉴定了一株肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 该菌株所产微生物絮凝剂对强碱性、成分复杂的天然碱碱泥具有较好的絮凝效果。为降低该微生物絮凝剂的生产成本, 从多种废水、废渣中筛选出适于该菌株产絮凝剂的培养基——豆腐渣培养基。对豆腐渣作培养基时的培养条件进行了优化, 对是否需要额外添加碳源、氮源进行了考察, 结果表明, 不需要额外添加任何营养成分, 豆腐渣浓度为 200g/L、初始 pH 值为 8、摇床转速为 160r/min、培养温度为 30℃时, 絮凝率最大, 达到 80%~84%。通过对豆腐渣成分的分析, 进一步表明豆腐渣中的营养成分能够满足菌体产絮凝剂的需要。本研究也为豆腐渣应用于其它发酵生产提供参考。

关键词: 微生物絮凝剂; 天然碱碱泥; 低成本培养基; 豆腐渣

1 引言

天然碱是一种重要的化工原料, 可以用来生产小苏打、烧碱、纯碱、芒硝碱及泡花碱等。目前, 天然碱生产加工过程中浑碱液澄清普遍采用的絮凝剂聚丙烯酰胺类高分子化合物, 虽具有成本低等优点, 但其

不能被降解, 且单体丙酰胺具有强致癌性和神经毒性^[1]。因此, 寻找高效、安全的絮凝剂, 具有重要意义。

微生物絮凝剂 (Microbial Flocculant, 简称 MBF) 是由微生物产生的生物大分子物质, 因其具有无毒、不会造成二次污染等特性而备受关注^[2-6]。目前, 微生物絮凝剂主要应用于污水处理领域, 所处理废水的 pH 值多是中性^[2-4], 将微生物絮凝剂应用到强碱性介质中

项目资助: 国家自然科学基金 (No. 20566005), 内蒙古自然科学基金 (No. 200607010203)

的报道很少^[7]。天然碱溶液是 pH 值接近于 12 的强碱溶液, 固形物含量高、盐浓度高, 且天然碱碱泥絮凝的目的是为了去除碱泥, 处理后的溶液要保证强碱性成分 NaHCO_3 、 Na_2CO_3 的含量基本不变, 能继续作为原料加工成产品。以上特点造成了天然碱碱泥的絮凝难度更大, 因此研究很少。从目前国内外的报道来看, 只有本课题组对天然碱碱泥用微生物絮凝剂进行过一系列较深入的研究^[8-10]。在研究中发现, 培养基成本过高是制约其应用的一个主要因素。为降低前期所分离絮凝剂产生菌种生产絮凝剂的生产成本, 本研究从各种废水废渣中寻找适合该菌株产絮凝剂的最佳培养基, 并对选出的豆腐渣培养基进行优化, 然后对豆腐渣的成分进行分析。这也为豆腐渣应用于其它发酵生产提供了参考。

2 材料和方法

2.1 菌种来源

菌种为前期从呼市淀粉厂废水中分离的菌株 TG-1, 当该菌株在细菌通用液体培养基中培养时, 对内蒙古鄂尔多斯市合同察汉淖尔碱湖天然碱碱泥的絮凝率为 80%, 稳定性较好, 短期内连续传 30 代后, 絮凝率仍在 70% 以上。经生理生化 and 16 rRNA 序列鉴定, 该菌株属于肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)。

2.2 低成本培养基的筛选

选择工业生产过程中的废水和废渣作为培养基, 不额外添加任何营养成分, 考察絮凝剂产生情况。

废水先用纱布过滤, 然后用自来水稀释成不同浓度。在废渣中加入一定量的自来水, 加热煮沸 15 min, 经纱布过滤, 得到不同浓度的培养基。二者均 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后使用。

分别用不同浓度的乳品废水 (内蒙古伊利集团)、啤酒厂废水 (内蒙古塞北星啤酒有限责任公司)、屠宰厂废水 (呼市西口子屠宰场)、淀粉废水 (呼市淀粉厂废水)、豆腐废水、豆腐渣 (呼市真正豆腐坊)、酱油渣和醋糟 (内蒙古盛谷酿造食品有限责任公司) 作为培养基培养絮凝剂产生菌 TG-1, 初始 pH 值为 8, 摇床转速 160 r/min, 培养温度 30 °C, 接种量为 5%, 培养 12 h 后, 取发酵液作为絮凝剂絮凝天然碱碱泥, 并测定絮凝率, 将不同培养基情况下, 絮凝率最大值进行比较。

2.3 絮凝率测定

准确称取 2.0000 g 干燥的天然碱泥 (取自内蒙古鄂尔多斯市合同察汉淖尔碱湖, 过 50 目筛), 放入 25 mL 比色管中, 加入 20 mL 左右的蒸馏水, 摇匀后放入 30 °C 恒温水浴锅中, 持续 30 min, 使碱泥中的天然碱充分溶解, 然后加入 1 mL 发酵液, 定容至 25 mL, 将比色管上下缓慢翻转 10 次, 使小絮体相互缔结成大絮体。2 min 后取上层清液在 752 型分光光度计 550 nm 处测定其吸光度值 B, 与不加发酵液之上清液的吸光度值 A 作对照, 按下式确定絮凝率 FR:

$$\text{FR} = (\text{A} - \text{B}) / \text{A} \times 100\%$$

2.4 培养基和培养条件

从 2.2 所用的各种低成本培养基中选择培养菌种时能达到最高絮凝率的培养基, 通过单因素实验确定产絮凝剂的最佳培养基浓度、初始 pH 值、摇床转速和培养温度, 并考察向该培养基中补加碳源、氮源是否会提高菌体产絮凝剂的能力。碳源的添加量为 2.0 g/L, 氮源的添加量为 3.0 g/L。

2.5 豆腐渣成分分析

本研究测定豆腐渣中各种碳源和各种氮源的含量, 并对豆腐渣中的主要元素 C、N、H 进行分析, 为豆腐渣在其它发酵过程中的应用提供参考。

2.5.1 还原糖浓度测定

利用 DNS 试剂法测定还原糖浓度。

2.5.2 总糖浓度测定

取 15 mL 豆腐渣液体培养基放入三角瓶中, 加入 10 mL 6 mol/L HCl, 置沸水浴中加热水解 1 h, 待三角瓶冷却后, 加入 1 滴酚酞指示剂, 用 6 mol/L NaOH 中和至微红色, 用蒸馏水定容在 50 mL 容量瓶中, 混匀。然后按还原糖浓度的测定步骤操作。

2.5.3 其它糖浓度测定

木糖、葡萄糖和鼠李糖利用 HPLC 法测定, 使用美国 Waters 公司生产的 1515 Breeze 型液相色谱测定豆腐渣中木糖、葡萄糖和鼠李糖的浓度。色谱条件为:

色谱柱: Hypersil 胺基柱 250 nm × 4.6 mm, 5 μm; 柱温: 35 °C; 流动相: 乙腈: 水 = 70: 30 (V/V); 真空泵脱气; 流速: 1 mL/min; 进样量: 25.0 μL。

2.5.4 总氮浓度测定

采用国家标准《碱性过硫酸钾消除紫外分光光度法》(GB11894-89) 测定总氮浓度。

2.5.5 氨氮浓度测定

采用纳氏试剂光度法测定氨氮浓度。

2.5.6 蛋白氮浓度测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白氮的含量。

2.5.7 元素分析

将 200 g/L 的豆腐渣培养基在恒温干燥箱内干燥至恒重，将样品制成粉末后，用 Vario ELIII 型元素分析仪（德国 Elementar 公司生产）分析豆腐渣中的碳、氮和氢元素的含量。

3 结果与分析

3.1 低成本培养基的筛选

不同浓度的乳品厂废水、啤酒厂废水、屠宰厂废水、淀粉厂废水、豆腐废水、豆腐渣、酱油渣和醋糟作为培养基时，测得所产絮凝剂的絮凝率见表 1。

Table 1 Effect of different culture medium with different concentration on biofloculant production

表 1 不同培养基在不同浓度下对菌株 TG-1 产絮凝剂的影响

培养基种类	培养基浓度	絮凝率
乳品废水	100%, 50%, 25%	8±2.0, 18±3.6 ^e , 4±1.0
啤酒废水	100%, 50%, 25%	17±2.6, 43±3.1 ^d , 39±4.6
屠宰厂废水	100%, 50%, 25%, 10%	27±1.0, 58±6.2, 61±2.6 ^e , 18±2.6
淀粉废水	100%, 50%, 25%, 10%	10±0.0, 26±1.7, 40±1.5, 42±3.0 ^d
豆腐废水	100%, 80%, 50%	38±2.6, 49±2.5, 62±5.0 ^e
豆腐渣	100 g/L, 200 g/L, 300 g/L, 400 g/L	60±3.6, 82±3.0 ^e , ±6.4, 47±2.0
酱油渣	100 g/L, 200 g/L, 300 g/L, 400 g/L	55±3.8, 68±3.0 ^b , 53±3.6, 42±2.3
醋糟	50 g/L, 150 g/L, 250 g/L	20±2.1, 37±3.8 ^d , 17±2.1

Note: The values of flocculation rate in the graph are: x ±s; within the columns of flocculation rate with different superscripts are significantly different.

由表 1 可见，当豆腐渣作培养基时，絮凝率最高，达到 82%，且显著高于其它培养基组（P<0.05）。说明利用单一的豆腐渣做培养基就能满足菌体产絮凝剂的要求，且絮凝率高于菌种筛选时使用的合成培养基。

3.2 低成本培养基培养过程条件优化

豆腐渣浓度、初始 pH 值、摇床转速、培养温度、

外加碳源和氮源对菌体产絮凝剂的影响见表 2。

Table 2 Effect of different concentration of soybean curb residue, initial pH, shaking velocity, temperature, addition of carbon sources, addition of nitrogen sources on biofloculant production

表 2 豆腐渣浓度，初始 pH 值，摇床转速，温度，碳源添加和氮源

添加对菌体产絮凝剂的影响							
浓度(g/L)	50	100	150	200	250	300	350 400
絮凝率 (%)	59±3.5 ^e	63±3.2 ^{e,d}	70±2.6 ^{c,b}	82±3.8 ^a	72±3.5 ^b	65±3.5 ^c	53±1.2 ^f 49±2.1 ^f
初始 pH 值	4	5	6	7	8	9	10
絮凝率 (%)	29±2.6 ^e	35±3.8 ^e	43±2.6 ^d	68±3.0 ^c	83±3.0 ^a	78±3.6 ^{b,a}	72±6.6 ^{b,c}
摇床转速 (r/min)	120	140	160	180	200	220	
絮凝率 (%)	72±3.2 ^d	81±2.6 ^{b,a}	84±3.0 ^a	77±3.8 ^{b,c}	73±2.6 ^{d,c}	70±1.7 ^d	
温度 (℃)	20	25	30	35	40		
絮凝率 (%)	66±4.2 ^c	75±3.6 ^{b,a,c}	84±4.7 ^a	79±6.1 ^{b,a}	70±7.1 ^{b,c}		
碳源种类	葡萄糖	果糖	蔗糖	可溶淀粉	乙醇	对照	
絮凝率 (%)	72±3.1 ^{b,a}	71±3.5 ^{b,a}	74±4.7 ^a	64±2.6 ^c	67±2.1 ^{b,c}	69±3.2 ^{b,a,c}	
氮源种类	硝酸钾	氯化铵	牛肉膏	蛋白胨	对照		
絮凝率 (%)	73±3.6 ^{b,c}	75±2.5 ^{b,a,c}	69±2.5 ^c	78±3.5 ^{a,b}	81±2.6 ^a		

Note: The values of flocculation rate in the graph are: x ±s; within the rows of flocculation rate with different superscripts are significantly different.

由表 2 可见，当豆腐渣浓度为 200 g/L 时，絮凝率最高，且显著大于其它浓度组（P<0.05）。当 pH 值为 8 时，絮凝率最高，但与 pH 值为 9 时絮凝率值的差异不显著（P>0.05）。当摇床转速为 160 r/min 时，絮凝率达最高值 84%，但与摇床转速为 140 r/min 时差异不显著（P>0.05）。当培养温度为 30℃时，絮凝率最高，但与温度为 25℃和 35℃时差异不显著（P>0.05），说明该菌株产絮凝剂的温度范围较宽。外加碳源对絮凝率的影响均差异不显著（P>0.05），说明豆腐渣完全能满足菌种碳源需要，不需要另加碳源。与未添加氮源的对照组相比，外加氮源反而使絮凝率降低，其中添加蛋白胨和氯化铵差异不显著（P>0.05），而添加硝酸钾和牛肉膏反而使絮凝率降低（P<0.05），说明豆腐渣能满足菌体的氮源需要，不需要另加氮源，有些氮源的添加反而会使絮凝率降

低。

3.3 豆腐渣培养基的成分分析

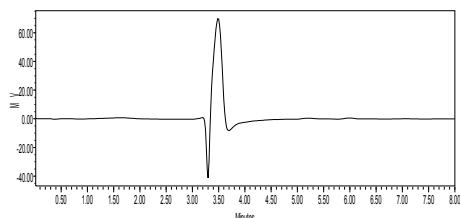


Fig1 HPLC chromatogram of soybean curd residue

图1 豆腐渣的高效液相色谱图

由图1可见, 高效液相色谱中只有溶剂峰, 没有单糖峰。说明豆腐渣中不含有木糖、葡萄糖和鼠李糖等单糖。碳源和氮源分析表明: 培养基中还原糖含量约为 0.0264 mg/mL, 多糖含量约为 2.674 mg/mL, 占总糖含量的 99%。总氮含量在 10 g/L-12 g/L 之间, 氮含量在 1.5 g/L-2.0 g/L 之间, 蛋白质含量在 2.87 g/L 左右。元素分析结果表明: 豆腐渣中 C、H、N 三种元素的含量分别为: 51.65%, 7.29%, 8.257%, C/N 为 7.085。豆腐渣成分分析结果表明: 豆腐渣中含有丰富的碳源和氮源, 适合作为发酵培养基使用。

4 结论

在前期研究中, 分离鉴定了一株高产絮凝剂菌株——肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 该菌株所产微生物絮凝剂对天然碱碱泥具有很好的絮凝效果。为降低生产成本, 本研究选用了 8 种废水和废渣作为培养基, 当单独使用它们作培养基时, 菌体仍然能产微生物絮凝剂, 其中豆腐渣作培养基时絮凝率最高。通过对豆腐渣作培养基时的培养条件进行优化, 确定了豆腐渣浓度为 200 g/L、初始 pH 值为 8、摇床转速为 160 r/min、培养温度为 30℃时, 絮凝率最大, 达到 80%-84%。在豆腐渣培养基中额外添加碳源和氮源不提高絮凝率, 这说明豆腐渣所含的营养成分完全能满足絮凝剂的生产。

近几年, 国内外在降低生物絮凝剂生产成本方面做了一些工作, 如利用酿酒废水^[11]、乳品废水^[12]、淀粉厂废水^[13]。然而, 在使用这些废水培养基时, 均需要额外添加氮源或无机盐等成分, 增加了运行成本。

而本研究使用的豆腐渣培养基, 不需要额外添加任何其它物质即可满足絮凝剂生产的需要, 成本更低。本研究对豆腐渣成分的分析结果, 也可为豆腐渣在其它发酵生产时的应用提供参考。

References (参考文献)

- [1] K.L. Dearfield, C.O. Abernathy, M.S. Ottley, et al. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity[J], *Mutation Research*, 1988, 195, P45-77.
- [2] Gong WenXin, Wang ShuGuang, Sun XueFei, et al. Biofloculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment [J], *Bioresource Technology*, 2008, 99(11), P4668-4674.
- [3] Gao Qi, Zhu Xiuhua, Mu Jun, et al. Using *Ruditapes philippinarum* conglutination mud to produce biofloculant and its applications in wastewater treatment [J], *Bioresource Technology*, 2009, 100(21), P 4996-5001.
- [4] He Jin, Zhen Quanwei, Qiu Ning, et al. Medium optimization for the production of a novel biofloculant from *Halomonas* sp. V3a' using response surface methodology [J], *Bioresource Technology*, 2009, 100(23), P 5922-5927.
- [5] Liu, Weijie, Yuan Hongli, Yang Jinshui, et al. Characterization of biofloculants from biologically aerated filter backwashed sludge and its application in dyeing wastewater treatment [J], *Bioresource Technology*, 2009, 100(9), P 2629-2632.
- [6] He Ning. Production and characterization of a novel biofloculant produced by *Bacillus licheniformis* [J], *New Biotechnology*, 2009, 25,(Supplement 1), P S230-S231.
- [7] Gao Qi, Zhu Xiu-Hua, Mu Jun, etc. Using *Ruditapes philippinarum* conglutination mud to produce biofloculant and its applications in wastewater treatment[J], *Bioresource Technology*, 2009, 100(21), P 4996-5001
- [8] Research on screening biofloculant producing strains for flocculating the clay in turbid natura soda solution and optima conditions for production of flocculant [J], *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(3), P459-465 (Ch).
刘占英, 张通, 张冬艳, 等. 絮凝天然碱碱泥的絮凝剂产生菌的筛选及最佳产絮条件研究[J], *环境科学学报*, 2006, 26(3), P459-465.
- [9] Lu Wenyu, Zhang Tong, Zhang Dongyan, et al. A novel biofloculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the trona[J], *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 27(1), P 1 - 7.
- [10] Qin Peiyong, Zhang Tong, Chen Cuixian. Flocculating Mechanism of Microbial Flocculant MBFTRJ21[J], *Environmental Science*, 2004, 25(3), P69-72.
秦培勇, 张通, 陈翠仙. 微生物絮凝剂 MBFTRJ21 的絮凝机理 [J]. *环境科学*, 2004, 25(3), P 69-72 (Ch).
- [11] Zhang Zhiqiang, Lin Bo, Xia Siqing, etc. Production and application of a novel biofloculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(6), P 667-673.
- [12] Shu-Guang Wang, Wen-Xin Gong, Xian-Wei Liu, etc. Production of a novel biofloculant by culture of *Klebsiella mobilis* using dairy wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 36(2), P 81-86
- [13] Li Zhong, Zhong Shan, Lei Heng-yi, etc. Production and application of a biofloculant by culture of *Bacillus licheniformis* X14 using starch wastewater as carbon source. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136(Supplement 1), P S313-S313