不同碳源培养胶球藻 C-169 净化糖蜜酵母废水

余宗苡[1]，闫文君[1]，李焕凯[2]，魏东[1]
（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）
（2.仲恺农业工程学院环境科学与工程学院，广东广州 510225）

摘要：本项目系统研究了三种碳源（CO_2、醋酸和甘油）添加到预处理后的糖蜜酵母废水，在藻菌共生条件下培养胶球藻 C-169 的生长情况及强化废水净化效果。结果表明，与通入空气相比，补充 2% CO_2，能显著提高细胞的平均比生长速率、生物质产率，分别是通入空气的 6.49、10.4 倍，显著提高了对脱色废水的总氮、总磷和氨氮去除率（p<0.05），但降低了废水 COD（化学需氧量）去除率。研究发现胶球藻 C-169 能够利用甘油作为其生长的碳源，在 0~20 g/L 甘油浓度时，随着甘油浓度的提高，细胞生长速率增大，总氮、总磷去除率提高，并在 20 g/L 时获得最高生物量干重达到 8.80 g/L，平均比生长速率是不添加甘油的 2.07 倍，生物量产率达 0.70 g/(L·d)。甘油浓度在 15 g/L 以上时，总氮、总磷去除率分别高达 85%、95%以上，极显著地提高了废水 COD（p<0.01）。添加 1~4 g/L 醋酸，均会抑制胶球藻 C-169 的生长，降低废水净化效果。因此在使用 C-169 净化 COD 较高的废水时，可添加甘油作为其生长的碳源。

关键词：胶球藻 C-169；碳源；糖蜜酵母废水；去除率
文章篇号：1673-9078(2019)01-152-156 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.022

Cultivation of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 using Different Carbon Sources to Purify Molasses Yeast Wastewater

YU Zong-yi[1], YAN Wen-jun[1], LI Huan-kai[2], WEI Dong[1]
(1.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Environmental Science and Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In this study, three carbon sources (CO_2, acetic acid and glycerol) were added to the pretreated molasses wastewater, and then the growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in a symbiotic algal-bacterial system cultured in such enhanced wastewater and the outcome of such an enhancement were examined. Compared with the results related to aeration with air, supplementation with 2% CO_2 could significantly increase the average cell growth rate and biomass yield by 6.49 and 10.4 times, respectively, and remarkably increased the total nitrogen, total phosphorus and ammonia nitrogen (p<0.05) but reduced the removal rate of COD (chemical oxygen demand) of wastewater. It was found that *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 could use glycerol as its carbon source. At a glycerol concentration within 0~20 g/L, an increase of glycerol concentration led to an increased cell growth rate, and total nitrogen and total phosphorus removal rates. At 20 g/L, the highest dry weight of biomass reached 8.80 g/L, the average specific growth rate was 2.07 times as high as that without glycerol (the biomass yield, 0.70 g/(L·d). When the glycerol concentration was above 15 g/L, the removal rates of total nitrogen and total phosphorus were over 85% and 95%, respectively, which significantly increased the wastewater COD (p<0.01). Addition of 1~4 g/L acetic acid would inhibit the growth of Coccomyxa subellipsoidea C-169 and reduce wastewater purification efficiency. Therefore, when C-169 is used to purify wastewater with a high COD, glycerin can be added as a carbon source for its growth.

Key words: *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; carbon source; yeast wastewater; removal rate

收稿日期：2018-04-17
基金项目：国家863科技计划项目（2013AA065802）；国家自然科学基金项目（31370383）；广州市科技计划项目（201704030084）；广东省海洋渔业科技与产业发展专项（A201401C01）；广东省公益研究与能力建设项目（2015A020216003；2016A010105001）
作者简介：余宗苡（1992-），女，硕士生，研究方向：微藻生物技术
通讯作者：魏东（1966-），男，博士，教授，博士生导师，研究方向：工业生物技术

酵母作为世界上应用最广的微生物之一，在酿酒、食品、医药、饲料、化妆品等领域有广泛的应用，其年产量高达300万吨。废糖蜜是酵母工业的主要原料，其中磷酸铵、氯化钠、硫酸铵、硫酸镁是培养酵母的主要营养物质[1]。生产过程包括糖蜜预处理、发酵以及酵母产品的分离、洗涤、干燥等。其中糖蜜预处理、发酵以及酵母产品的分离和洗涤所产生废水的COD（化学需氧量）量占综合废水90%以上。由于酵母发酵过程糖蜜消耗不完全，在生产过程中会产生美拉德色素、类黑精、多酚类色素[2]，因此酵母废水具有高色值、富含大量有机物的特点。此类废水可生化性差、营养比例失调、难降解成分多，是处理难度非常大的废水之一。盲目排放，会破坏土壤结构，污染地下水，造成生态系统的破坏。目前国内外的主要处理方法包括：蒸发浓缩法、生物处理法、物化工艺结合法等。

微藻是一类分布广泛，具有光合性能的自养生物。由于其生长迅速、富含高价值产物，在生产色素、蛋白质、多糖和生物柴油等产品生产方面已实现商业化。近年来，由于环境污染与能源危机不断加剧，微藻在废水处理方面的应用受到各国研究者的关注[3,4]。微藻在生长过程中可吸收大量的氮磷和有机物，降低废水的营养负荷，达到净化水质的目的。利用微藻处理糖蜜酵母废水，可将废水中的酵母蛋白质、纤维素、胶体物质、残糖以及丰富的氮、磷、钾、钙、铁等无机微量元素进行资源化综合利用，转化为藻类生物质，但酵母废水中碳、氮比不协调是导致废水生化处理效率不高的一个重要原因[5]。向酵母废水中补充可以被微藻利用的廉价碳源，如 CO_2 废气、粗甘油等，使碳氮比处于适合藻的生长范围，是提高酵母废水生化处理效率的有效途径[6]

胶球藻 C-169 是第一个完成测序的极地真核微藻[7]，因其生长在极端地域，对环境具有极大的耐受能力。大量的研究表明胶球藻 C-169 在生产生物柴油方面具有极大的潜力[8]，然而对其在废水处理方面的研究报道却非常有限。本文以极地微藻胶球藻 C-169 为研究对象，通过添加三种碳源的方式强化酵母废水净化效果，在藻菌共生条件下寻找胶球藻 C-169 生长和废水处理效果的最适条件，实现酵母废水净化和高产胶球藻 C-169 生物量双赢结果，以期为以后工业化高密度培养胶球藻 C-169 处理酵母废水、生产生物质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) NIES 2166（C-169）原种购于日本 NIES 藻种库；糖蜜酵母废水来自广东五洲药业有限公司；葡萄糖、硝酸钠、硫酸镁、醋酸、甘油等均为分析纯；CO_2 气体纯度≥99.8%，购自广东顺德佛伦气体有限公司；测 COD、总氮、总磷的试剂购自美国 HACH 公司；AL104 型电子天平和 SevenEasy 型 pH 计购自瑞士 Mettler Toledo 公司；Allegra 25R 型高速冷冻离心机购自美国 Beckman Coulter 公司；DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司；DHZ-DA 型恒温摇床购自太仓实验设备厂；BFM-6BⅡ型高压灭菌锅购自英国 ASTELL 公司；DRB200 型数字式消解器和 DR2700 型便携式分光光度计购自美国 HACH 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 浓缩种子液制备

在 250 mL 三角瓶中以 10%（*V*/*V*）的接种量将预先培养的胶球藻 C-169 一级种子液接入 100 mL 培养基（添加 20 g/L 葡萄糖），置于恒温摇床 27 ℃、150 r/min 混养培养 6 d。取 6 瓶种子液，分装到 50 mL 灭菌离心管中，6000 r/min 高速离心 3 min，去上清，用无菌去离子水悬浮藻细胞，重复离心洗涤 3 次后，用无菌去离子水悬浮藻细胞定容至 80 mL，该浓缩藻液作为后期实验的种子液。

1.2.2 糖蜜酵母废水脱色预处理

将冷冻的糖蜜酵母废水解冻至室温，使其混合均匀后，用 10%的盐酸溶液调整其 pH 值至 3.0。取 200 mL 酵母废水至 500 mL 烧杯中，按浓度为 3 g/100 mL 的剂量添加活性碳粉 200#，置于磁力搅拌器上以 300 r/min 搅拌 0.5 h 后，分别用 200、300、400 目筛绢真空抽滤除去大部分活性炭，再分别用定性滤纸、0.45 μm 水相滤膜真空抽滤除去残留的活性炭[9]。

1.2.3 补充 CO_2 对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

将 400 mL 脱色废水与去离子水按 1:2 比例混合，调整 pH 值至 6.1，分装到 12 个灭菌后的 250 mL 三角瓶中，装液量为 100 mL。在 12 个培养瓶中非灭菌条件下接种胶球藻 C-169，初始接种浓度为 1.50 g/L。取 6 瓶置于 CO_2 培养箱中，CO_2 浓度保持在 2%；6 瓶置于恒温摇床中。培养温度均为 27 ℃，转速为 150 r/min，连续光照 10 d，光强为 4500±500 lux。每隔 48 h 取样 3 mL，12000 r/min 离心 3 min，收集上清液进行水质分析。藻泥用去离子水悬浮，1200 r/min 离心 5 min，去除悬浮有细菌的上清液，重复 5 次后，上清液无色透明，然后用 3 mL 去离子水悬浮藻泥，用分光光度

计测 680 nm 下 OD 值。收集培养 10 d 后的藻液，8000 r/min 下高速离心 5 min。去上清，藻泥用去离子水洗涤离心 3 次，置于-80 ℃冰箱冷冻 24 h，真空冷冻干燥 48 h 制备藻粉。

1.2.4 补充甘油对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

将 500 mL 脱色废水与去离子水按 1:2 比例混合，平均分装到 5 个 500 mL 烧杯中，将粗甘油按 0 g/L，5.0 g/L，10.0 g/L，15.0 g/L，20.0 g/L 添加到稀释废水中，用 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节初始 pH 至 6.1，分装到 15 个 250 mL 三角瓶中，每瓶装液量为 100 mL。在 15 个培养瓶中非灭菌条件下接种胶球藻 C-169，初始接种浓度为 1.50 g/L。将培养瓶置于恒温摇床中培养，在 27 ℃、150 r/min 下连续光照培养 10 d，光强为 4500±500 lux。培养起始和结束时各取样 4 mL，12000 r/min 离心 3 min，收集上清液进行水质分析。藻泥经洗涤、烘干后差量法得干重。

1.2.5 补充醋酸对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

将 500 mL 脱色酵母废水与去离子水按 1:2 比例混合，平均分装到 5 个 500 mL 烧杯中，按 0、1.0、2.0、3.0、4.0 g/L 添加醋酸，调节初始 pH 至 6.1，再分装到 15 个 250 mL 三角瓶中，每瓶装液量为 100 mL。在 15 个培养瓶中非灭菌条件下接种胶球藻 C-169，初始接种浓度为 1.50 g/L。把培养瓶置于恒温摇床中培养，在 27 ℃、150 r/min 下连续光照培养 10 d，光强为 4500±500 lux。培养起始和结束时各取样 4 mL，12000 r/min 离心 3 min，收集上清液进行水质分析。藻泥经洗涤、干燥后差量法得干重。

1.3 分析测试

1.3.1 生物量干重

采用烘干法测干重时。废水培养所得藻泥用去离子水悬浮，1200 r/min 离心 5 min，去除悬浮有细菌的上清液，重复 5 次后，上清液基本无色透明，然后转移至已称恒重的 2 mL 离心管中，12000 r/min 离心 3 min，去除上清后置于 60 ℃烘箱烘至恒重，差量法得干重。

1.3.2 比生长速率

通过干重计算出不同培养条件下胶球藻的比生长速率 μ（d^{-1}）。比生长速率计算公式：

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

其中：N_2、N_1 分别是两次测定的生物量干重浓度值；t_2、t_1 分别是两次测定的时间，单位为 d。

1.3.3 酵母废水 COD、总氮、总磷测定

使用 HACH 公司专用试剂盒，按照试剂盒操作步骤，样品稀释到测量范围，加入试剂后在不同温度下于消解器 DRB200 上进行消解，消解完全并冷却后，在 DR2700 分光光度计中测定。

1.3.4 废水脱色率

用 2.5 mL 注射器吸取废水，用 0.45 μm 滤器过滤，测滤液在 475 nm 处吸光值为 OD_1；测定活性炭预处理出水在 475 nm 处吸光值为 OD_2。活性炭预处理前后酵母废水脱色率可表示为：

$$\eta=(OD_1-OD_2)/OD_1\times100\%$$

1.4 数据分析

采用Microcal Origin V8.0 Software对数据进行处理和统计。

2 结果与讨论

2.1 补充 CO_2 对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

在稀释三倍的脱色酵母废水中分别添加 2% CO_2 和空气（CO_2 浓度为 0.03%，*V/V*）培养胶球藻 C-169，初始接种密度为 1.50 g/L。C-169 生长曲线、最高生物量以及平均比生长速率见图 1。从图 1a 可看出，培养前 4 d，胶球藻 C-169 在空气和 2% CO_2 中都有显著生长。4~10 d，在空气组的生长速率趋于平稳，在 2% CO_2 中生长速率提高，在第 10 d，$OD_{680\,nm}$ 达到最高（17.5）。有研究表明，在微藻培养过程中补充 CO_2 可显著的提高其生长速率及其胞内脂类含量，同时增加 COD、BOD（生物需氧量）、TN、TP 的去除率[10]。从图 1b 可以看出与通入空气相比，通入 2% CO_2 可提高细胞的平均比生长速率 6.49 倍；培养 10 d 后，补充 2% CO_2 可获得最高生物量浓度达 5.66 g/L，产率为 0.42 g/(L·d)，显著高于空气对照组（p<0.01）。

想在补充 2% CO_2 与通入空气下比较胶球藻 C-169 对稀释三倍的脱色酵母废水净化效果见表 1 所示。从表 1 可知，补充 2% CO_2 提高了胶球藻 C-169 对脱色酵母废水总氮、总磷以及氨氮去除率，分别是通入空气对照组的 1.52、1.48、1.43 倍。补充 2% CO_2 和通入空气下胶球藻 C-169 对磷酸盐的去除率均为 100%，而对总磷的去除率为 94.62%，说明在此培养体系下，胶球藻 C-169 最先吸收磷酸盐形式的磷元素，其次再利用其它形态的磷。空气组的 COD 去除率比补充 CO_2 组高 17.27%，原因可能是 2% CO_2 对照组中

培养基中会溶解一定量的气体 CO_2，提高了废水的 COD。

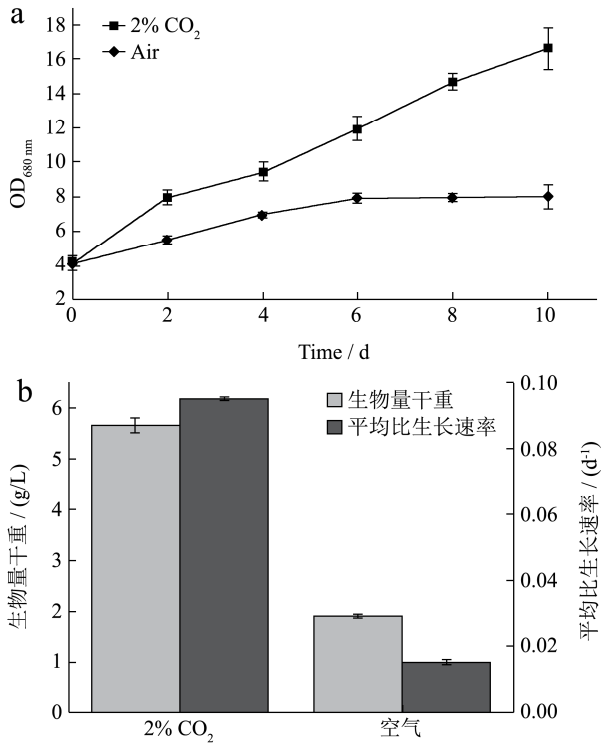


图 1 补充 CO_2 对脱色废水中胶球藻 C-169 生长的影响

Fig.1 Effect of CO_2 supplement on cell growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in pretreated yeast wastewater

表 1 补充 2% CO_2 下胶球藻 C-169 对脱色酵母废水净化效果

Table 1 Cleaning effect of pretreated yeast wastewater by *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cultured with 2% CO_2 supplementation

去除率/%	2% CO_2	空气
COD	55.27±0.02	72.54±0.01
总氮	80.83±0.03	53.27±0.006
总磷	94.62±0.002	64.02±0.03
NH_3-N	87.11±0.03	60.96±0.01
PO_4^{3-}	100.00%±0.03	100.00%±0.06

2.2 补充甘油对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

在稀释三倍的脱色酵母废水中添加不同浓度的甘油培养胶球藻 C-169，初始接种密度为 1.5 g/L，培养 10 d 后其生物量干重及平均比生长速率见图 2。从图中可看出，在甘油浓度为 0~20 g/L 时，甘油浓度的含量与 C-169 生长速率成正相关，随着甘油浓度的提高，胶球藻 C-169 细胞生长速率和生物量浓度显著提高（p<0.01）。培养基中甘油浓度为 20 g/L 时，胶球藻 C-169 的最高生物量达到 8.80 g/L，平均比生长速率是不添加甘油的 2.07 倍，生物量产率达 0.70 g/(L·d)。此研究表明，胶球藻 C-169 能够利用甘油作为其生长的碳源。文献报道，添加 10 g/L 从生物柴油中分离出的废弃甘油能显著促进普通小球藻的生长和油脂积累[11]，而胶球藻 C-169 能利用高浓度甘油在脱色废水中快速生长，对实现废甘油资源化利用和酵母废水的净化有很大意义。

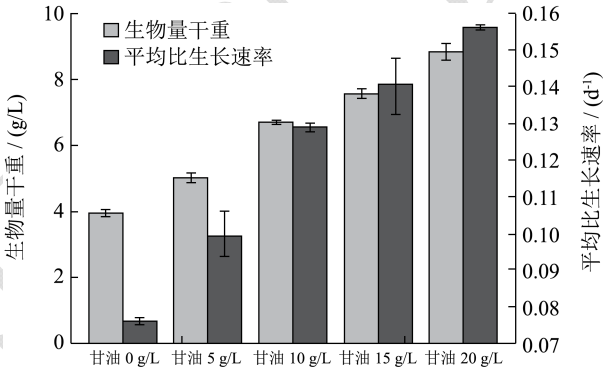


图 2 补充甘油对胶球藻 C-169 在脱色酵母废水中生长影响

Fig.2 Effect of glycerol supplementation on growth rate and biomass concentration of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 grown in pretreated yeast wastewater

比较添加不同浓度甘油对胶球藻 C-169 净化脱色酵母废水的影响，其结果如表 2 所示。从表 2 可以看出，随着甘油浓度的增加，胶球藻 C-169 对 COD 的去除率逐渐降低。胶球藻 C-169 培养 10 d 后仍不能完全将甘油转化为藻类生物质，并且甘油浓度越高，水质的 COD 越高。随着甘油浓度的提高增大了细胞的生长速率，总氮、总磷去除率随之提高。与不添加甘油相比，添加 20 g/L 的甘油对 TN、TP 的去除率分别提高了 35.27%、7.15%。甘油浓度为 15 g/L 以上时，总氮、总磷去除率均可高达 85%、95%以上。

表 2 补充甘油对胶球藻 C-169 净化脱色酵母废水的影响

Table 2 Effect of glycerol supplementation on cleaning effect of pretreated yeast wastewater by *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

去除率/%	甘油 0 g/L	甘油 5 g/L	甘油 10 g/L	甘油 15 g/L	甘油 20 g/L
COD	48.08±0.01	31.49±0.34	27.01±0.24	25.41±0.61	22.42±0.087
TN	53.64±0.02	69.09±0.03	76.00±0.02	87.45±0.02	88.91±0.02
TP	89.66±0.14	94.12±0.05	94.45±0.34	95.79±0.07	96.81±0.01

表 3 补充醋酸对胶球藻 C-169 净化脱色酵母废水的影响

Table.3 Effect of acetate supplement on cleaning effect of yeast wastewater by *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

项目	HAC 0 g/L	HAC 1 g/L	HAC 2 g/L	HAC 3 g/L	HAC 4 g/L
COD 去除率	49.08%±0.02	48.97%±0.03	48.09%±0.02	47.51%±0.01	44.98%±0.01
TN 去除率	58.00%±0.01	50.73%±0.01	38.91%±0.02	36.00%±0.03	34.55%±0.03
TP 去除率	90.33%±0.03	86.47%±0.05	82.09%±0.03	73.36%±0.02	58.07%±0.02

2.3 补充醋酸对胶球藻 C-169 生长和废水净化效果的影响

在稀释三倍的脱色酵母废水中添加不同浓度的醋酸培养胶球藻 C-169，初始接种密度为 1.5 g/L，第 10 d 生长情况见图 3。从图中可看出，在醋酸浓度为 3.0 g/L、4.0 g/L 的脱色酵母废水中，培养 10 d 细胞死亡，培养基颜色呈黄色，醋酸浓度为 0、1.0、2.0 g/L 的培养基中，藻细胞生长正常，颜色为墨绿色。培养至 10 d，胶球藻 C-169 在醋酸浓度为 0、1.0、2.0 g/L 的培养基中生物量干重分别为 4.65、4.30、3.29 g/L。结果表明，在脱色酵母废水中，胶球藻 C-169 不能利用高浓度醋酸作为其生长的碳源，高浓度醋酸钠对其细胞生长有抑制作用。刘香华[12]等人研究了 0~10 g/L 醋酸钠浓度对小球藻生长的影响发现，醋酸钠不能促进小球藻细胞生长，张森[13]等人发现醋酸钠对微藻 *Ourococcus multisporushk* 12 细胞生长有显著促进作用，这说明不同的藻种对醋酸根的利用能力不同。

比较添加不同浓度醋酸对胶球藻 C-169 净化脱色酵母废水的影响，其结果如表 3 所示。废水 COD、总氮、总磷的去除率跟胶球藻 C-169 的生长情况呈正相关，补充醋酸抑制胶球藻 C-169 的生长，同时降低了脱色酵母废水净化效果。醋酸根的存在提高了废水的 COD，降低了 COD 的去除率。



图 3 补充醋酸对胶球藻 C-169 在脱色废水中生长影响

Fig.3 Effect of acetate supplement on cell growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in pretreated yeast wastewater

3 结论

本研究对比分析了三种碳源对胶球藻 C-169 净化糖蜜酵母废水的影响，结果表明补充 2% CO_2 对细胞的平均比生长速率、脱色酵母废水总氮、总磷以及氨氮去除率有显著的提高，但废水的 COD 去除率会降低；添加甘油可将总氮、总磷去除率分别提高到 85%、95%以上，但也会降低废水 COD 的去除率；醋酸对藻细胞生长有抑制作用，不能作为胶球藻 C-169 生长的碳源。因此，在使用胶球藻 C-169 处理 COD 较高的废水时，可添加甘油作为其碳源，提高废水净化效果。

参考文献

[1] 李知洪,肖冬光,梁音.以糖蜜为原料的酵母废水处理技术[J].酿酒科技,2010,7:86-88
LI Zhi-hong, XIAO Dong-guang, LIANG Yin. Treatment technology of molasses-based yeast wastewater [J]. China Brewing Science and Technology, 2010, 7: 86-88

[2] Liakos T I, Lazaridis N K. Melanoidins removal from simulated and real wastewaters by coagulation and electro-flotation [J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 242(15): 269-277

[3] Han S F, Jin W B, Tu R J, et al. Biofuel production from microalgae as feedstock: Current status and potential [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015, 2: 1-14

[4] Venkata M S, Nikhil G N, Chiranjeevi P, et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives [J]. Bioresource Technology, 2016, 215: 2-12

[5] Su H Y, Zhang Y L, Zhang C M, et al. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(21): 9884-9890

[6] Robinson T, Mcmullan G, Marchant R, et al. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative [J]. Bioresource Technology, 2001, 77(3): 247

[7] Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, et al. The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation [J]. Genome Biol, 2012, 13(5): R39

（下转第 136 页）