

两种微藻对高浓度酵母发酵废水中细胞耐受能力的比较

魏东, 陈娇敏, 巴音克西克

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, 简称 *C. py*)和二形栅藻(*Scenedesmus dimorphus* NIES-119, 简称 NIES-119)在异养生长中对蔗糖的耐受浓度, 进而比较了对高浓度酵母发酵废水的细胞耐受性。结果表明, *C. py* 和 NIES-119 在蔗糖浓度高达 70 g/L 的培养基中仍有高比生长速率 (0.90 d^{-1} 和 0.63 d^{-1}), 最大生物量浓度可达到 3.37 g/L 和 2.84 g/L。酵母废水添加糖蜜后, COD 可高达 $10^4\sim 10^5\text{ mg/L}$ 并伴随有总氮、总磷的高浓度, *C. py* 和 NIES-119 在这类废水培养基中的最高比生长速率为 0.43 d^{-1} 和 0.42 d^{-1} , 最大生物量浓度可达到 1.95 g/L 和 1.70 g/L, 均极显著高于不加糖蜜的废水培养基中的最高值; 同时, *C. py* 对废水培养基中 COD、总氮、总磷的最高去除率分别高达 34.56%、20.00% 和 20.63%, NIES-119 则分别高达 21.46%、31.25% 和 16.11%。结果说明这两种微藻在耐受高浓度酵母废水、通过生长净化废水中都具有巨大潜力。

关键词: 酵母发酵废水; 蛋白核小球藻; 栅藻; 耐受性; 异养生长

文章编号: 1673-9078(2013)12-2839-2843

Comparison of Cell Tolerance Capacity of Two Microalgae Species to High Concentration Wastewater from Yeast Fermentation

WEI Dong, CHEN Jiao-min, BAYIN Ke-xi-ke

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In the present work, the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 were analyzed to investigate the tolerant concentrations of sucrose and the cell tolerance capacity to high concentration wastewater from yeast fermentation. The results showed that *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 had high specific growth rates (0.90 d^{-1} and 0.63 d^{-1} , respectively) in medium containing high concentration of sucrose up to 70 g/L, and the maximal biomass concentrations reached to 3.37 g/L and 2.84 g/L, respectively. After adding molasses in the wastewater medium, the chemical oxygen demand (COD) of $10^4\sim 10^5\text{ mg/L}$ was observed with high concentration of total nitrogen and phosphorus. The maximal specific growth rates and highest biomass concentrations were 0.43 d^{-1} and 1.95 g/L, respectively, for *Chlorella pyrenoidosa*, and were 0.42 d^{-1} and 1.70 g/L, respectively, for *Scenedesmus dimorphus* NIES-119, which were significantly higher than the maximum in the molasses-free wastewater medium. Furthermore, the highest removal rates of COD, total nitrogen and total phosphorus were 34.56%, 20.63% and 20.00%, respectively, by *Chlorella pyrenoidosa* and 21.46%, 16.11% and 31.25%, respectively, by *Scenedesmus dimorphus* NIES-119. These results demonstrated the two kinds of microalgae had feasibility and great potential for wastewater cleaning.

Key words: wastewater from yeast fermentation; *Chlorella pyrenoidosa*; *Scenedesmus dimorphus*; tolerance; heterotrophic growth

酵母工业是食品、发酵、医药行业的重要支柱, 而酵母发酵废水是在利用糖蜜为原料发酵生产酵母(包括糖蜜预处理、发酵、分离、酵母洗涤)过程中产

收稿日期: 2013-08-08

基金项目: 国家 863 研究发展计划 (2013AA065802); 广东省教育部产学研结合重点项目 (2011A090200073); 国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目 (GHME2011SW04)

作者简介: 魏东 (1966-), 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为工业生物技术

生的高浓度废水^[1], 具有水量大、浓度高 (COD $3\sim 11\times 10^4\text{ mg/L}$)、色度高、难生物降解的特点, 严重制约了酵母行业的清洁生产^[2]。酵母废水中氮磷含量高、发酵过程中微生物代谢产物复杂以及碳、氮比不协调等原因导致废水的生化处理效率不高^[3]。目前国内重点研究酵母废水的絮凝处理、膜过滤、氧化处理和厌氧污泥床的工艺改进和设备改进^[4]。

微藻能够利用水体中的碳、氮、磷进行生长并合成所需的蛋白质、核酸等细胞成分, 能有效去除城市

污水和畜牧污水中的氮磷^[5]。在众多微藻中,小球藻和栅藻对污水中氮、磷的去除效率最高^[6]。微藻生长速度快且油脂含量高,微藻油脂含量一般占生物量干重的 20~50%,可用作生产生物燃料的原料,提取油脂后剩余的藻细胞残余能用作高蛋白含量的动物饲料或作为一种氮源用作农作物肥料。利用微藻处理废水不会产生二次污染并能获得具有综合价值的微藻细胞,是一种优于传统处理技术的高效环保方法。利用污水培养微藻在低浓度的污水处理中应用广泛,有利于降低微藻培养成本和污水处理成本,但对于处理酵母废水这类高浓度废水,首先面临的难题就是藻种对废水的耐受性和生长特性。本文通过添加糖蜜为微藻生长补充碳源并提高酵母废水的浓度,系统比较蛋白核小球藻和二形栅藻对高浓度蔗糖、高 COD、高氮磷的耐受能力,为利用它们处理高浓度酵母废水提供应用基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 由北京大学陈峰教授惠赠;二形栅藻 (*Scenedesmus dimorphus* NIES-119) 购自日本 National Institute for Environmental Studies (NIES) 微生物种质库 (Microbiol Culture Collection)。酵母发酵废水、糖蜜由广东五洲药业有限公司提供。蔗糖、葡萄糖、硝酸钠、苯酚、硫酸等均为分析纯;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-6B II 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 藻种活化与种子液制备

从斜面上分别挑取一环 *C. py* 和 NIES-119 藻细胞,在灭菌的含 10 g/L 葡萄糖的改良 Basal 培养基^[7]固体平板上划线,置于光照培养箱中,26 °C、2000 lux 光照恒温培养,光暗周期为 12 h/12 h。藻种活化 5 d 后,挑取一个单藻落,接种于装有 100 mL Basal 培养基的 250 mL 三角瓶中(含 10 g/L 葡萄糖),在 28 °C、2000 lux、130 r/min 条件下连续光照培养 6 d。

1.2.2 两种微藻对异养培养基中蔗糖浓度的耐受能力

配制含有蔗糖浓度为 20、30、40、50、60 和 70 g/L 的改良 Basal 培养基,在 250 mL 三角瓶中装 50 mL 培养基,灭菌后在生物安全柜中分别接种 *C. py* 和 NIES-119 种子液,接种量为 8% (V/V)。接种后放入摇床,在 28 °C、160 r/min 条件下黑暗培养 6 d。24 h 取一次样,每次取样 4 mL,取样后在 2 mL Eppendorf 管中 8000 r/min 离心 5 min,弃去上清,藻泥用蒸馏水离心洗涤 3 次,70 °C 烘干至恒重,称干重并计算各蔗糖浓度下的细胞比生长速率。

1.2.3 两种微藻对酵母废水培养基的耐受能力和废水净化效果

先测定酵母发酵废水和糖蜜的水质性质,通过添加糖蜜分别配制总糖浓度为 10、20、30 g/L 的酵母废水培养基(无氮磷的改良 Basal 配方)。以不加糖蜜的酵母废水培养基为对照,在 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL,灭菌后分别接种 *C. py* 和 NIES-119 种子液,接种量为 8% (V/V),接种后放入摇床,在 28 °C、160 r/min 条件下黑暗培养 6 d。24 h 取一次样,每次取样 4 mL,取样后在 2 mL Eppendorf 管中 8000 r/min 离心 5 min,吸取上清液在 -20 °C 冷冻保存以进行废水分析;藻泥用蒸馏水离心洗涤 3 次,70 °C 烘干至恒重,称干重并计算细胞比生长速率和废水指标去除率。

1.3 分析测试

1.3.1 细胞比生长速率

$$\text{比生长速率: } \mu = (\ln B_2 - \ln B_1) / (T_2 - T_1)$$

注: μ : 比生长速率 (d^{-1}); B_1 、 B_2 : 对数生长期中 T_1 、 T_2 时的细胞干重 (g/L); T_1 、 T_2 : 培养时间 (d)。

1.3.2 总糖浓度

用苯酚-硫酸法^[8]测定酵母废水和糖蜜中的总糖浓度,测定具体步骤如下:

1.3.2.1 标准曲线的制作

按参考文献^[8]步骤进行,得回归方程: $y = 13.613x + 0.0539$ ($R^2 = 0.9946$),其中 y 为吸光度, x 为葡萄糖浓度 (g/L)。

1.3.2.2 样品测定

酵母发酵废水在 4000 r/min 下离心 5 min 以除去固体悬浮物,上清稀释 260 倍后准确吸取 2.0 mL 于 10 mL 试管中,按上述方法测试,设置三个平行样;糖蜜稀释 1000 倍,其他相同。根据回归方程式计算葡萄糖含量,再乘以 0.9 转化为总糖浓度,再乘以稀释倍数得总糖浓度。

1.3.3 COD、总氮、总磷浓度

酵母发酵废水、糖蜜及废水培养基的 COD、总氮、总磷浓度测定按 HACH 公司 DRB200 型数字式消解器和 DR2007 型分光光度计规定的试剂盒和操作步骤进行。样品经稀释后,先用特定消解液在不同温度下消解,然后在分光光度计中测定。

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 两种微藻对异养培养基中蔗糖浓度的耐受能力

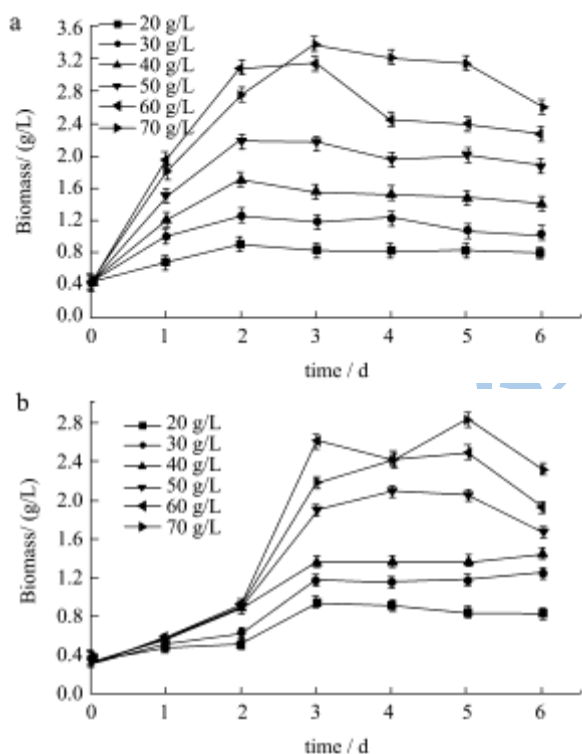


图1 不同蔗糖浓度下 *C. py* (a) 和 *NIES-119* (b) 的生长曲线
Fig.1 Growth curve of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 in heterotrophic medium with different sucrose concentrations

两种微藻在含有不同浓度蔗糖的异养培养基中的生长曲线见图 1, 其比生长速率的比较见表 1。由图 1 可知, 在黑暗条件下, *C. py* (图 1a) 和 *NIES-119* (图 1b) 都能利用蔗糖为唯一碳源进行快速生长, 生长规律一致, 即生物量随着蔗糖浓度增加而增加, 都在 70 g/L 蔗糖浓度下达到最高生物量浓度 (3.37 g/L 和 2.84 g/L), 但达到的时间 *C. py* 比 *NIES-119* 更早。可能的原因是: *C. py* 的接种量比 *NIES-119* 更高, 分

别为 0.45 g/L 和 0.33 g/L; (2) *C. py* 比 *NIES-119* 生长更快 (见表 1)。两者均在 60 g/L 蔗糖浓度下达到最大比生长速率 (分别为 0.96 d⁻¹ 和 0.69 d⁻¹), 而 *NIES-119* 存在明显的迟缓期。它们都能在 70 g/L 蔗糖浓度下拥有高比生长速率。

表 1 *C. py* 和 *NIES-119* 在不同蔗糖浓度下的比生长速率
Table 1 Specific growth rates of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 in heterotrophic medium with different sucrose concentrations

藻种	蔗糖浓度/(g/L)					
	20	30	40	50	60	70
蛋白核小球藻	0.35	0.52	0.67	0.79	0.96	0.90
二形栅藻 <i>NIES-119</i>	0.35	0.43	0.47	0.58	0.69	0.63

酵母发酵废水的主要成分为酵母蛋白质、纤维素、胶体物质以及未被充分利用的糖蜜中的残糖^[1], 而糖蜜中含糖高, 其中蔗糖含量占 40% 左右^[9]。关于微藻利用蔗糖的已有研究结果存在矛盾甚至相反的报道, 如, 有研究发现在光照和黑暗条件下蛋白核小球藻都不能利用蔗糖生长, 也有报道认为黑暗条件下蛋白核小球藻不能利用蔗糖而栅藻能利用蔗糖缓慢生长^[10], 甚至有研究发现光照条件下蛋白核小球藻在蔗糖浓度为 30 g/L 的培养下能利用蔗糖生长^[11]。本研究发现 *C. py* 和 *NIES-119* 都能在蔗糖浓度高达 70 g/L 的条件下高速异养生长, 对高浓度蔗糖都有很好的耐受性, 且 *C. py* 比 *NIES-119* 生长更快, 这就说明藻种不同, 对蔗糖的利用和耐受能力差异很大。

2.2 两种微藻对添加糖蜜的高浓度酵母废水培养基的耐受能力

2.2.1 酵母废水培养基的水质特性

表 2 不同酵母废水培养基的水质特性

Table 2 Water quality of different mediums containing yeast wastewater

总糖浓度 (g/L)	COD (×10 ⁴ mg/L)	总氮 (×10 ³ mg/L)	总磷 (×10 ² mg/L)
37.53(糖蜜)	56.48±0.91	58.40±0.99	170.40±3.81
6.83(酵母发酵废水)	2.24±0.07	3.35±0.14	2.84±0.12
10.00(废水加糖蜜)	7.89±0.20	9.80±0.35	28.65±0.81
20.00(废水加糖蜜)	28.85±0.60	13.90±0.63	112.40±3.52
30.00(废水加糖蜜)	43.20±0.85	24.90±0.13	149.00±4.24

酵母发酵废水、糖蜜、添加糖蜜后的酵母废水培养基, 其 COD、总氮、总磷分析结果见表 2。由表 2 可知, 通过添加糖蜜为微藻异养生长提供蔗糖为碳源, 同时也大幅度提高了废水培养基的浓度, 以此研

究两种微藻对高浓度酵母发酵废水的耐受能力。

2.2.2 两种微藻在不同酵母废水培养基中的异养生长

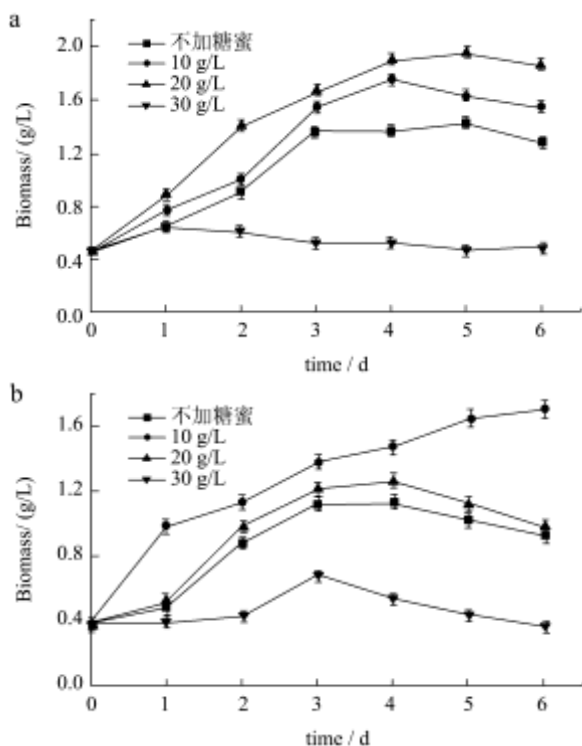


图2 *C. py* (a)和 NIES-119 (b)在不同浓度酵母废水培养基中的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 in heterotrophic medium with different concentrations of yeast wastewater

两种微藻在不同浓度酵母废水培养基中的生长曲线和比生长速率比较见图2和表3。从图2可以看出,两种微藻在总糖浓度为10 g/L和20 g/L的酵母废水培养基中的生物量浓度极显著高于不添加糖蜜的酵母废水培养基 ($P < 0.01$), 其中 *C. py* (图2a)和 NIES-119 (图2b)分别在含有20 g/L和10 g/L总糖的废水培养基中达到最高生物量浓度(1.95 g/L和1.70

表4 *C. py*和 NIES-119对不同酵母废水的净化效果

Table 4 Cleaning efficiency of different yeast wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119

藻种	培养基总糖浓度/(g/L)	COD 去除率/%	总氮去除率/%	总磷去除率/%
蛋白核小球藻	6.83(酵母发酵废水)	7.95±0.11	12.04±0.17	14.35±0.24
	10.00(废水加糖蜜)	19.44±0.36	18.75±0.36	15.56±0.25
	20.00(废水加糖蜜)	34.56±0.39	20.00±0.41	20.63±0.31
二形栅藻 NIES-119	6.83(酵母发酵废水)	9.64±0.14	15.18±0.27	10.99±0.21
	10.00(废水加糖蜜)	21.46±0.33	31.25±0.25	16.11±0.22
	20.00(废水加糖蜜)	13.42±0.29	23.53±0.16	12.24±0.13

两种微藻对不同浓度酵母废水的净化效果见表4。从表4结果可以看出, *C. py*和 NIES-119分别对总糖浓度为20 g/L和10 g/L的废水培养基中COD、总

g/L)。这一结果表明, 尽管添加糖蜜后废水培养基中的浓度大大提高(见表2), 但糖蜜的加入为微藻生长提供了碳源, 有效促进了细胞生长。因此, 两种微藻不仅能耐受高浓度酵母废水, 并且最大比生长速率(分别为0.43 d⁻¹和0.42 d⁻¹)高于相对低浓度的酵母废水培养基对照(分别为0.35 d⁻¹和0.29 d⁻¹)(见表3)。然而, 它们在总糖浓度为30 g/L的酵母废水培养基中几乎不生长(见图2), 说明过高浓度可能已经超出了它们的耐受能力, 故两种微藻的耐受性是有限的。此外, *C. py*和 NIES-119在酵母废水培养基中的最大比生长速率(0.43 d⁻¹和0.42 d⁻¹)极显著低于纯蔗糖培养基中的最大比生长速率(0.96 d⁻¹和0.69 d⁻¹)。这两种生长抑制现象的可能原因是: (1)糖蜜成分复杂, 混有大量的非糖成分和杂质(如黑色素、重金属离子、胶体物质等)^[12], 大量加入糖蜜对两种微藻均有生长抑制作用; (2)酵母废水中含有发酵过程中的微生物代谢产物、高浓度硫酸根^[2], 也可能同时抑制了微藻生长。上述结果还可看出, *C. py*和 NIES-119分别在总糖浓度为20 g/L、10 g/L的含糖蜜培养基中生长状况最好, 说明 *C. py*对高浓度酵母废水培养基的耐受能力高于 NIES-119。

表3 *C. py*和 NIES-119在不同酵母废水培养基中的比生长速率

Table 3 Specific growth rates of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus dimorphus* NIES-119 in heterotrophic medium with different concentrations of yeast wastewater

藻种	酵母废水中总糖浓度/(g/L)			
	6.83	10.00	20.00	30.00
蛋白核小球藻	0.35	0.40	0.43	0.14
二形栅藻 NIES-119	0.29	0.42	0.38	0.19

2.2.3 两种微藻对高浓度酵母废水的净化效果比较

磷、总氮的去除率最高。虽然上述最高去除率只有16~35%, 但结合图2和表3的结果可知, 两种微藻在此高浓度酵母废水培养基中仍能保持高生长速率

(0.43 d^{-1} 和 0.42 d^{-1}) 和高生物量浓度 (1.95 g/L 和 1.70 g/L)。这一现象说明两种微藻对酵母废水的净化能力与微藻的生长速率和细胞密度正相关,这是由于吸收氮、磷用于微藻生长是氮、磷去除的主要机制^[13]。因此,在两种微藻耐受能力范围内,糖蜜的添加为微藻生长补充了碳源,促进了微藻的生长,同时提高了对酵母废水的净化能力。

虽然 *C. py* 对蔗糖和高浓度酵母废水的耐受能力优于 NIES-119,但在净化能力上,NIES-119 对总氮的去除率要明显高于 *C. py*,这与已有的研究结果一致^[14];而 *C. py* 对 COD 和总磷的去除率高于 NIES-119。这些结果表明,不仅耐受能力和生长速率是影响两种微藻对酵母废水净化效率的重要因素,而且不同微藻种类对净化废水的优势也不同。混合两种微藻共培养可能具有更大的应用潜力。

3 结论

蛋白核小球藻和二形栅藻 NIES-119 异养条件下能耐受浓度高达 70 g/L 的蔗糖,比生长速率高达 0.96 d^{-1} 和 0.69 d^{-1} ,且蛋白核小球藻对蔗糖的耐受能力高于二形栅藻 NIES-119。它们都能耐受高浓度酵母废水,比生长速率和对废水的净化能力都显著高于相对低浓度的废水,且蛋白核小球藻对高浓度酵母废水的耐受能力高于栅藻 NIES-119,而栅藻 NIES-119 对总氮的去除率高于蛋白核小球藻。今后有望采用提高接种量、或混合接种以结合两种微藻净化废水的优势等方式进一步提高生物量产率和废水净化效率。

参考文献

- [1] 高以烜,姚仕仲,刘淑秀,等. UF、NF 处理酵母废水可行性研究[J]. 水处理技术,1997,23(1):12-17
GAO Yi-heng, YAO Shi-zhong, LIU Shu-xiu, et al. Feasibility study of yeast wastewater treatment by UF and NF [J]. Technology of water treatment, 1997, 23(1): 12-17
- [2] 王文祥,韦朝海,吴超飞,等. A/O 生物流化床—混凝工艺处理酵母废水试验研究[J]. 工业水处理,2006,26(4):15-18
WANG Wen-xiang, WEI Chao-hai, WU Chao-fei, et al. Experiment of treating wastewater of a yeast plant by A/O biological Fluidized beds and flocculation process [J]. Industrial Waste Treatment, 2006, 26(4): 15-18
- [3] 李知洪,肖冬光,梁音. 以糖蜜为原料的酵母废水处理技术[J]. 酿酒技术,2010,7:86-92
LI Zhi-hong, XIAO Dong-guang, LIANG Yin. Treatment techniques of molasses-based yeast wastewater [J]. Liquor-making science and technology, 2010, 7: 86-92
- [4] Yu Zhou, Zhen Liang, Yanxin Wang. Decolorization and COD removal of secondary yeast wastewater effluents by coagulation using aluminum sulfate [J]. Desalination, 2008, 225: 301-311
- [5] Su Hong yang, Zhang Ya lei, Zhang Chunmin, et al. Clutivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 9884-9890
- [6] Grantar M, Gajin S, Dalmacija B. The possibility of phosphate elimination by the use of algae in the process of wastewater purification [J]. Mikrobiologia, 1984, 21(1): 63-67
- [7] Xian-Ming Shi, Feng Chen, et al. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains [J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9: 445-450
- [8] 郭雷,吕明生,王淑军,等. 苯酚-硫酸法测定樱桃酒中总糖[J]. 食品研究与开发,2010,31(6):130-131
GUO Lei, LV Ming-sheng, WANG Shu-jun, et al. Determination of total sugar from cherry wine by phenol-sulfuric acid method [J]. Food research and development, 2010, 31(6): 130-131
- [9] 王兰,肖冬光. 以甘蔗糖蜜为碳源发酵生产海藻糖的研究[J]. 生物技术,2003,13(3):30-32
WANG Lan, XIAO Dong-guang. Fermentation production of trehalose using sugar cane molasses as carbon source [J]. Biotechnology, 2003, 13(3): 30-32
- [10] H Samejima, J Myers. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Microbiology, 1958, 18: 107-117
- [11] J Theriault. Heterotrophic growth and production of xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Applied Microbiology, 1965, 18(3): 402-416
- [12] 王湘茹,于淑娟. 甘蔗糖蜜澄清处理及处理前后组分分析[J]. 中国调味品,2010,35(2):64-68
WANG Xiang-ru, YU Shu-juan. The pretreatment of sugarcane molasses and analysis on component [J]. China condiment, 2010, 35(2): 64-68
- [13] Yanyan Su, Artur Mennerich, Brigitte Urban. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high potential microalgal species [J]. Bioresource Technology, 2012, 124: 157-162
- [14] Luz Estela González, Rosa Olivia Canizares, Sandra Baena. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* [J]. Bioresource Technology, 1997, 60: 259-262

现代食品科技