

耐高 COD 淀粉废水的高产油脂粘红酵母的驯化和筛选

钟娜 张志平 张华 张栩 谭天伟*

(北京化工大学 生命科学与技术学院 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要:为减轻高 COD 淀粉废水对产油菌株粘红酵母生长的抑制,提高油脂产量,本文利用淀粉废水对该菌株进行了耐高 COD 梯度驯化,并采用流式细胞仪对经尼罗红染色的粘红酵母细胞进行了高油脂含量菌株的筛选。结果表明:经多次驯化后,粘红酵母耐受淀粉废水 COD 高达 75000 mg/L;流式细胞仪筛选得到一株油脂含量为 25.7% (质量分数)的粘红酵母,比原始菌株油脂提高了 140%。400 L 发酵罐实验表明,在初始 COD 75000 mg/L,葡萄糖质量浓度为 36 g/L, pH 4.8 及 30 ℃ 条件下,培养 33 h 后,粘红酵母生物量达 25.3 g/L,菌体油脂含量为 29.5%, COD 降至 5600 mg/L,降解率为 92.5%。

关键词:粘红酵母;淀粉废水;流式细胞仪;微生物油脂

中图分类号: Q939

引言

淀粉废水是食品工业中污染较严重的废水之一^[1]。该废水中主要含有少量淀粉、纤维、蛋白质、糖类等高浓度有机物。如果直接采用工艺处理淀粉废水,则不仅因有机物浓度太高对处理造成很大困难,而且也因废水中有用物质的直接排放而造成很大的浪费^[2]。微生物油脂又称为单细胞油脂,是生物柴油的原材料。许多微生物,如酵母、霉菌和藻类等都能够一定条件下以碳水化合物、碳氢化合物等为碳源,在体内积累脂肪酸甘油酯^[3]。然而,利用纯糖类或含糖农业作物为原料生产微生物油脂成本太高,不利于规模化放大^[4-5]。含糖工业废水因其含有大量的还原性糖,而且分布集中,排放量大,是一个值得尝试研究的微生物碳源来源。

利用粘红酵母处理高 COD 淀粉废水,生产微生物油脂的同时降低淀粉废水的 COD,可实现废水的资源化利用,并且解决生物油脂生产原料问题^[2, 6-8]。之前相关研究都是取 COD 较低工段的淀粉废水(通常 COD < 30000 mg/L)^[9-10]或对淀粉废水适当稀释,以降低废水 COD 浓度^[2],所以如何驯化筛选适应高浓度 COD 废水生长且油脂含量较

高的菌株成为研究的首要任务。尼罗红染色剂是一种荧光染料,可以与细胞内的油脂进行特异性的结合,用尼罗红对细胞内油脂染色^[11],并利用流式细胞仪筛选油脂含量高的菌种是一种非常快速方便的方法^[12-13]。

本文尝试采用 COD 梯度驯化粘红酵母,经多次驯化筛选适应高浓度 COD 淀粉废水的粘红酵母。尼罗红染色后,经流式细胞仪筛选,得到了一株耐高 COD、高产油脂的粘红酵母菌株,大大节省了筛选菌种繁杂的工作量。

1 材料和方法

1.1 菌种

出发菌株为本实验室保藏的粘红酵母菌株 (*Rhodotorula glutinis*)。

1.2 培养基配方

液体淀粉废水培养基成分是 $V_{\text{麸质水}}:V_{\text{浸泡液}}=4:1$, 4% 葡萄糖。固体淀粉废水培养基的成分是 $V_{\text{麸质水}}:V_{\text{浸泡液}}=4:1$, 20% 葡萄糖^[2], 2% 琼脂。(麸质水、浸泡液为不同工段的淀粉废水,培养基中无需再加入除糖以外的其他营养物质)。

1.3 试剂与仪器

浓硫酸,重铬酸钾,氯仿,三氯甲烷,甲醇, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 分析纯,北京化工厂;尼罗红荧光染料,上海杰美基因医药科技有限公司。

HYG-A 型回转恒温调速摇床,江苏太仓市实验设备厂;COD 快速测试仪,包括 CR3200 型加热消解

收稿日期: 2012-03-19

基金项目: 国家“863”计划(2009AA033001)

第一作者: 女, 1986 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

器和 PhotolabS, 光电比色计, 德国 WTW 公司; 紫外诱变箱, 济南洁康空气净化设备厂; 流式细胞仪, BD 公司; 5 L 发酵罐, 上海暴行生物工程设备有限公司。

1.4 驯化和紫外诱变方法

将粘红酵母接种到淀粉废水培养基中发酵, 测其生长状况, 72 h 后, 再转接到新鲜淀粉废水培养基中进行下一轮的驯化, 如此重复多次。

取直径 9 cm 无菌平板, 培养基为淀粉废水固体培养基, 涂布稀释至合适浓度的粘红酵母菌悬液, 在等距 40 cm、功率为 25 W 紫外灯下照射。

1.5 尼罗红染色方法

取 200 μL 发酵液离心, 用磷酸缓冲液洗涤 2 次, 再加入含 KCl 0.15 mol/L 的无菌磷酸缓冲液溶解。取 40 μL 尼罗红染色剂到 160 μL 的丙酮中, 向上述处理后的菌液中加入 20 μL 尼罗红丙酮溶液, 避光, 放在摇床中染色 30 min。取出后, 离心, 用 PBS 洗涤菌体 2 次, 洗去附着的染色剂, 离心收集菌体, 再用 4 mL 无菌磷酸缓冲液溶解菌体。

1.6 分析方法

COD 由 COD 测定仪测得; 油脂含量(质量分数)的测定采用氯仿甲醇法^[2]; 菌体细胞质量浓度测定采用干重法; 残糖由 SBA 生物传感分析仪测得。

2 结果与讨论

2.1 菌种的驯化

淀粉废水的 COD 较高, 粘红酵母在 COD 值较高的淀粉废水中较难生长, 需要对菌种进行驯化, 才能缩短发酵延滞期, 提高生物量。对菌种在未添加水的淀粉废水培养基(初始 COD 为 75000 mg/L)中进行了 6 代驯化, 结果如图 1 所示。

图 1 表明驯化第 1 代的粘红酵母和经几代驯化后粘红酵母生长延滞期的变化状况。第 1 代驯化结果显示, 发酵 22 h 后菌体生物量干重仅为 2.7 g/L, 且发酵 72 h 后, 菌体生物量干重为 4.95 g/L, 而经过 6 代驯化, 发酵 22 h 时生物量干重为 9.9 g/L, 且在发酵末期 72 h, 菌体生物量干重为 20.25 g/L, 由图可知驯化效果十分显著, 而且最后 3 次驯化菌种的延滞期趋于稳定, 初步验证了菌种耐受 COD 浓度达 75000 mg/L 淀粉废水的稳定性。此菌株耐受 COD 的能力, 比本实验室之前所做的耐 COD 30000 mg/L 的菌种^[2]有很大提高。且目前, 生物发酵法处理高 COD 淀粉废水多采用 COD 较低工段的废水(COD <

30000 mg/L), 或用水对废水进行稀释, 初步降低其 COD 值, 再利用菌体处理。而本文利用驯化菌直接对 COD 高达 75000 mg/L 的淀粉废水进行处理, 有助于避免因稀释废水而造成的水资源浪费。

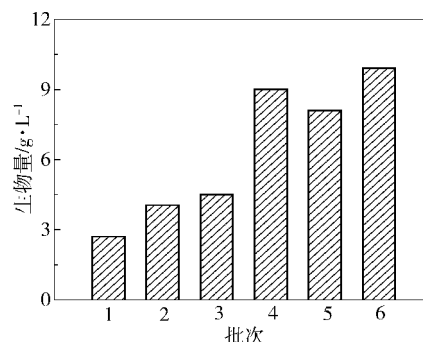


图 1 淀粉废水中不同驯化批次粘红酵母延滞期的生物量比较

Fig. 1 Lag phases of different batches in starch wastewater

2.2 菌种的紫外诱变

对驯化后的粘红酵母进行常规紫外诱变, 然后用流式细胞仪筛选油脂含量较高的菌株。首先绘制其紫外诱变存活率曲线: 取 9 个直径 9 cm 无菌平板, 涂布稀释至合适浓度的粘红酵母菌悬液, 在等距 (40 cm)、功率为 25 W 紫外灯下, 将其中 8 个分别照射 4、5、6、7、8、9、10、11 min 等不同时间, 诱变后将经诱变的 8 个平板和未经诱变的平板放在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 72 h。将诱变平板的单菌落数目和未经诱变平板的单菌落数目进行比较, 绘制其致死率曲线如图 2 所示。从图 2 可知, 紫外诱变 8 min 时, 存活率在 10% ~ 20% 之间, 此诱变时间最佳。

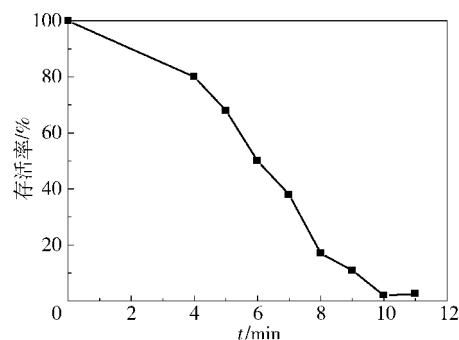


图 2 粘红酵母紫外诱变存活率曲线

Fig. 2 Lethal curve of UV mutation of *Rhodotorula glutinis*

取一定量培养到对数期的耐高 COD 淀粉废水粘红酵母的发酵液, 稀释到一定浓度后, 将液体直接导入无菌表面皿中, 按照 1.4 节中所述条件在紫外灯下照射 8 min, 进行诱变。

2.3 流式细胞仪高通量筛选高油脂含量菌种

流式细胞仪可以对经荧光染料染色的物质进行高通量筛选,在医学中应用普遍。而利用流式细胞仪对高油脂含量粘红酵母进行高通量筛选还鲜有报道。本文利用流式细胞仪对经尼罗红荧光染料染色的淀粉废水驯化菌进行筛选,以期获得高油脂产量的菌种并大大减少筛选菌种的工作量。

将诱变后菌液接入新鲜淀粉废水培养基中培养 72 h 后,用尼罗红对菌种进行染色,然后通过流式细胞仪进行高通量筛选,以期筛选出油脂含量较高的菌株。染色后,将菌液过滤,用流式细胞仪进行分析,得到的谱图如图 3 所示。

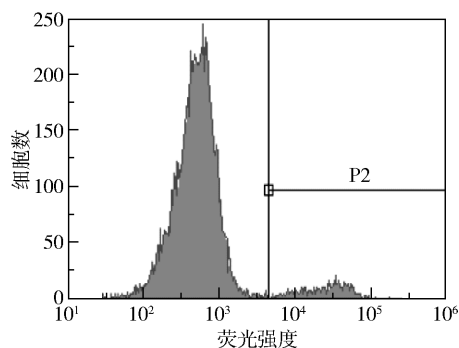


图 3 未经分选粘红酵母流式分析图

Fig. 3 Flow cytometry analysis of mutagenic stains

由图 3 可见,横坐标表示荧光强度,荧光强度大的区域表示细胞内的油脂含量较高。图 3 中明显看出,细胞分为两个群体,荧光强度较小的细胞峰面积较大,油脂含量少,而荧光强度较大的细胞面积小,油脂含量高,此部分细胞为诱变后,发生明显正突变的细胞,最终选定上图 P2 门中油脂含量较多的细胞,将其分离收集。

对第一次分选收集到的细胞再用流式细胞仪进行分析,验证分选结果,如图 4 所示。可得到明显的两个峰,经分析,左边荧光强度较小的为假阳性细胞的特征峰,右边荧光强度较强且细胞数量较多的细胞特征峰是我们想要得到的高产油脂粘红酵母细胞的特征峰。

继续对图 4 中油脂含量较高的 P2 门中的细胞进行分选。分选后细胞用流式细胞仪分析,结果如图 5 所示。经过第二次分选,荧光强度较弱的即油脂含量较低的细胞明显减少,荧光强度较大的细胞即油脂含量较多的细胞占整个细胞群的主体。

将分选得到的细胞涂平板,没有杂菌产生,并对其进行摇瓶发酵培养,在 72 h 时测其油脂含量为

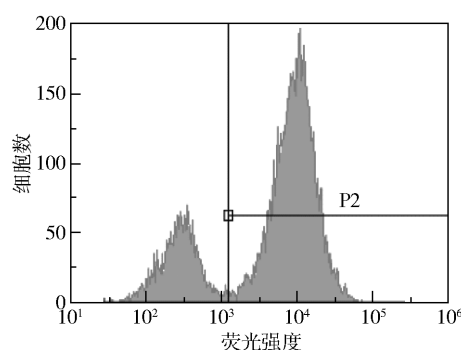


图 4 经一次分选后粘红酵母流式分析图

Fig. 4 Flow cytometry analysis of stains after screening once

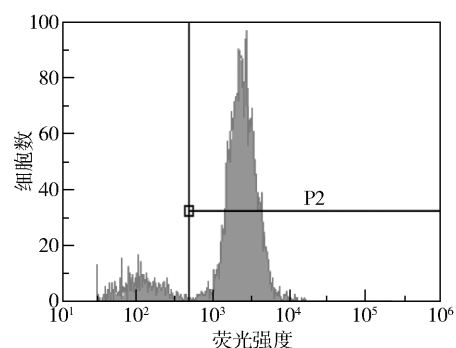


图 5 经两次分选后粘红酵母流式分析图

Fig. 5 Flow cytometry analysis of stains after screening twice

25.7%。将诱变分选前的初始菌株在同样条件下摇瓶培养,测其 72 h 的油脂含量为 10.7%,可得经诱变分选后细胞比分选前细胞内油脂含量提高了 140%,效果非常明显。流式细胞仪多用于医学中的细胞分选,而对生产菌种的分选应用较少,da Silva 等^[14]曾利用流式细胞仪对粘红酵母内的油脂进行检测,但未对高产菌株进行分选。且本文筛选的粘红酵母细胞的油脂含量比 da Silva 等所用菌种的油脂含量有较大的优势。利用流式细胞仪可对粘红酵母细胞进行反复多次的筛选,进一步提高菌种的油脂含量。

2.4 筛选菌种的放大培养

2.4.1 5 L 发酵罐

将分选后的细胞收集保存,并传代。在 5 L 发酵罐中利用淀粉废水培养基进行放大实验,验证筛选后细胞的生长特性和油脂产量。在初糖质量浓度为 36 g/L(当发酵罐中的糖低于 10 g/L 时进行补糖)、pH = 4.8、接种量 10% 的条件下发酵,结果如图 6 所示。

由图 6 可见,经过流式细胞仪筛选后的细胞在 5 L 淀粉废水发酵罐中生长效果良好。发酵 72 h,生

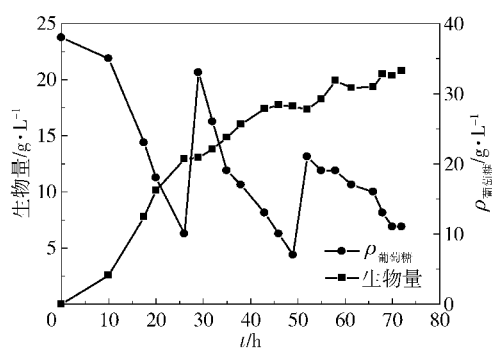


图 6 流式分选后的粘红酵母 5 L 发酵罐实验

Fig. 6 Fermentation of screening stains in 5 L fermentor

物量干重为 20.79 g/L, 收集发酵 72 h 的菌体测其油脂含量为 26% 与 2.3 节中, 细胞油脂含量 25.7% 基本一致。由此可见, 经流式细胞仪筛选后的细胞生长非常稳定, 且油脂含量稳定。

2.4.2 400 L 发酵罐

进一步将筛选到的粘红酵母在 400 L 发酵罐中进行中试发酵实验验证其稳定性。发酵废水培养基中 $V_{\text{麸质水}}:V_{\text{浸泡液}}=4:1$, 在初始糖质量浓度为 36 g/L (当发酵罐中的糖低于 10 g/L 时进行补糖)、pH = 4.8、接种量 10% 的条件下发酵, 结果如图 7 所示。

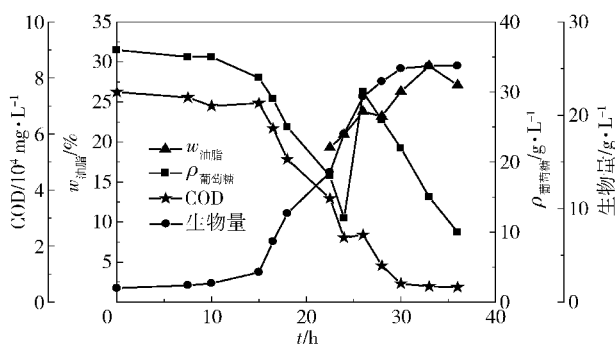


图 7 400 L 中试发酵试验

Fig. 7 400 L pilot scale fermentation

由图 7 可知, 粘红酵母的生物量在 33 h 时生物量干重为 25.3 g/L, 菌体油脂含量为 29.5%。发酵前淀粉废水的 COD 为 75000 mg/L, 发酵 33 h 后淀粉废水的 COD 为 5600 mg/L, COD 的降解率为 92.5%。

3 结论

(1) 多次驯化后, 粘红酵母耐受淀粉废水 COD 高达 75000 mg/L; 流式细胞仪筛选得到一株油脂含量为 25.7% 的粘红酵母, 比原始菌株提高了 140%, 显著减少了菌种筛选的工作量。

(2) 400 L 发酵罐中, 初始 COD 浓度 75000 mg/L, 葡萄糖质量浓度为 36 g/L, pH 4.8, 30 °C 条件下, 培养 33 h 后, 生物量达 25.3 g/L, 菌体油脂含量为 29.5%, COD 降至 5600 mg/L, 降解率为 92.5%。

参考文献:

- [1] Lu N, Zhou S G, Zhuang L, et al. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43: 246-251.
- [2] Xue F Y, Gao B, Zhu Y Q, et al. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 6092-6095.
- [3] 薛照辉, 吴谋成. 微生物油脂进展[J]. 山西食品工业, 2002(2): 10-12.
Xue Z H, Wu M C. Research advance of microbial oils[J]. Shanxi Food Industry, 2002(2): 10-12. (in Chinese)
- [4] Lara Pizarro A V, Park E Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth[J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 1077-1082.
- [5] Han H W, Cao W L, Zhang J C. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO₂ as co-solvent[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3148-3151.
- [6] Xue F Y, Zhang X, Luo H, et al. A new method for preparing raw material for biodiesel production[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1699-1702.
- [7] 邢旭, 薛飞燕, 谭天伟, 等. 粘红酵母在味精废水中发酵生产油脂[J]. 生物加工过程, 2010, 8(1): 6-8.
Xing X, Xue F Y, Tan T W, et al. Investigation on oil production by *Rhodotorula glutinis* in waste water from glutamate process[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(1): 6-8. (in Chinese)
- [8] 朱永强, 薛飞燕, 邢旭, 等. 粘红酵母和酿酒酵母联合处理味精废水[J]. 生物加工过程, 2010, 8(5): 17-20.
Zhu Y Q, Xue F Y, Xing X, et al. Treatment of monosodium glutamate wastewater by *Rhodotorula glutinis* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(5): 17-20. (in Chinese)
- [9] 王姗姗, 朱海峰, 陈金发. 马铃薯淀粉废水处理技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(8): 4845-4847.
Wang S Y, Zhu H F, Chen J F. Research progress of treatment methods of potato starch wastewater[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2012, 40(8): 4845-

4847. (in Chinese)
- [10] 王宏勋, 邓张双, 周帅, 等. 利用淀粉废水生产多不饱和脂肪酸初步研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(6): 94–95.
- Wang H X, Deng Z S, Zhou S, et al. Elementary study on using amylum wastewater to produce polyunsaturated fatty acids[J]. Environmental Science and Technology, 2007, 30(6): 94–95. (in Chinese)
- [11] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. Journal Microbiological Methods, 2004, 56: 331–338.
- [12] Katsuragi T, Tani Y. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(3): 217–222.
- [13] Edwards B S, Oprea T, Prossnitz E R, et al. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8: 392–398.
- [14] da Silva T L, Feijão D, Reis A. Using multi-parameter flow cytometry to monitor the yeast *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 batch growth and oil production towards biodiesel[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2010, 162: 2166–2176.

Domestication and screening of *Rhodotorula glutinis* with resistance to high chemical oxygen demand (COD) starch wastewater for lipid production

ZHONG Na ZHANG ZhiPing ZHANG Hua ZHANG Xu TAN TianWei

(Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: In order to decrease the inhibition of the high chemical oxygen demand (COD) wastewater on the growth of an oil-producing strain—*Rhodotorula glutinis*—and thereby increase oil production, the domestication of strains with resistance to high COD was performed in starch wastewater. Screening of strains with high lipid production obtained from Nile Red staining of *Rhodotorula glutinis* cells was completed by flow cytometry. After multiple domestication steps, *Rhodotorula glutinis* could tolerate starch wastewater with COD up to 75000 mg/L. One *Rhodotorula glutinis* with a lipid content of 25.7% screened by flow cytometry had a lipid content which was 140% higher than the original. A 400 L fermentor experiment showed for initial conditions of 75000 mg/L COD, 36 g/L glucose and pH 4.8, after culturing for 33 h at 30 °C, the biomass could reach 25.3 g/L and the bacterial lipid content reached 29.5%, while COD decreased to 5600 mg/L. The degradation ratio was 92.5%.

Key words: *Rhodotorula glutinis*; starch wastewater; flow cytometry; microbial oil