

酵母菌降解苯酚同时生产单细胞蛋白

刘 慧, 杨柳燕, 肖 琳, 陈 鹏

(南京大学环境学院 污染控制与资源化国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘 要: 在不同初始苯酚浓度的培养液中振荡培养瓶形酵母菌 (*Pityrosporum sp.*), 探讨了初始苯酚浓度、TOC 以及酵母生物量间的相互关系。结果表明, 苯酚的降解同酵母生长有极大的相关性, 初始苯酚浓度升高, 抑制酵母生物量增加, 转化率下降; 在苯酚的降解过程中, TOC 的下降与苯酚同步, 苯酚完全降解后 TOC 主要来自酵母代谢产物。对于初始苯酚浓度为 $559.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液, 降解 90% 的苯酚可获得酵母 $328.2 \text{ mg}(\text{生物量}) \cdot \text{L}^{-1}$, 并可使培养液 TOC 降解约 87.3%。

关键词: 苯酚; 瓶形酵母菌; 单细胞蛋白; 总有机碳

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2043(2004)04 - 0810 - 04

Production of Single Cell Proteins by Degradation of Phenol Under Cultivation of Yeast *Pityrosporum sp.*

LIU Hui, YANG Liu-yan, XIAO Lin, CHEN Peng

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Biodegradation of phenol contained in wastewater is a well-known method characterized by its lower cost and without further pollution. In the present research, *Pityrosporum sp.* was cultivated and reclaimed later as a method for production of single cell proteins under different initial phenol concentrations. Thus, this research is useful for wastewater treatment and harvesting new findings to degrade phenol. Degradations of phenol and total organic carbon (TOC) by *Pityrosporum sp.* with *Pityrosporum sp.* growth process were discussed. The results showed that phenol degradation was correlated greatly with *Pityrosporum sp.* growth. The higher phenol degraded rate, the more *Pityrosporum sp.* biomass increased. Because *Pityrosporum sp.* biomass was well expressed in means of *Pityrosporum sp.* OD_{500} , we were able to safely take OD_{500} as index of *Pityrosporum sp.* biomass in its exponential growth phase in the later research. Net biomass of *Pityrosporum sp.* decreased and longer time cost for the complete degradation of phenol if the initial phenol concentration was higher. Increased nitrogen and phosphor concentrations may accelerate the speed of phenol degradation, but no increase of the final *Pityrosporum sp.* biomass. Thus, initial phenol concentration was the limiting factor of *Pityrosporum sp.* activity to degrade phenol. The degradation of TOC was correlated with phenol concentrations in the process of phenol degradation, and phenol reduction was accompanied with TOC's decrease and *Pityrosporum sp.* biomass's increase. TOC was made up of *Pityrosporum sp.* metabolites mainly when phenol was completely degraded in the cultures, which was well demonstrated by the final TOC if the same amount of *Pityrosporum sp.* was put into the axenic distilled water. TOC decreased in the process of phenol degradation. With the complete degradation of phenol, TOC concentration remained constant. The *Pityrosporum sp.* biomass of 328.2 mg could be harvested in per liter of culture, and 87.3% of TOC could be degraded if 90% of phenol was degraded at initial phenol concentration of $559.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. However, just only 256.0 mg of biomass could be harvested and 80% of TOC could be degraded if 90% of phenol was degraded at initial phenol concentration of $745.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In conclusion, decreasing of the initial phenol concentration will increase the final biomass's transformation rate and reduce the total time for complete degradation of phenol, and the degradation of phenol contained in wastewater using *Pityrosporum sp.* was a very promising method.

Keywords: phenol; *Pityrosporum sp.*; single cell proteins; total organic carbon

收稿日期: 2003 - 11 - 19

基金项目: 南京市科技局资助项目(20022035)

作者简介: 刘 慧(1979—), 女, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: huilmb@vip.sina.com

含酚废水主要来源于焦化、煤气、炼油和以苯酚或酚醛为原料的化工、制药等生产过程,其数量多、危害大,是各国水污染控制中列为重点解决的有毒有害废水之一,因此,苯酚被美国环保局列为 129 种优先控制的污染物之一^[1]。目前含酚废水的处理技术主要有氧化分解技术、分离再生技术和生物处理技术^[2,3]。微生物降解含酚废水作为生物处理技术的代表,具有成本低且无二次污染的特点,因此得到广泛应用。目前对苯酚降解菌的研究主要集中于细菌,而对酵母菌的相关研究相对较少。大量文献报道单细胞蛋白(Single Cell Protein, SCP)的生产原料主要有甲醇以及淀粉、味精、酿酒和柠檬酸等生产过程的废水^[4-7]。而酵母菌降解苯酚回收菌体生产单细胞蛋白,实现废物资源化的相关报道则更少。本研究利用瓶形酵母菌(*Pityrosporum sp.*)降解苯酚同时回收酵母单细胞蛋白,着重分析苯酚、总有机碳(Total Organic Carbon, TOC)以及酵母生物量的变化及相互关系。

1 试验条件和方法

1.1 酵母菌接种液制备本试验

采用的菌株为本实验室分离保存的瓶形酵母菌。将酵母菌在无菌条件下接入已灭菌的培养基(C_6H_5OH 0.8, NH_4Cl 1.7, KH_2PO_4 0.5, Na_2HPO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.3 $g \cdot L^{-1}$),在 $150 r \cdot min^{-1}$, $30^\circ C$ 条件下培养 36 h。所得培养物用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,除去菌体附着的培养液,最后用无菌生理盐水制成细胞悬液于 $4^\circ C$ 冷藏保存。

1.2 试验步骤

接种前测定模拟苯酚废水中初始苯酚浓度和 TOC, $121^\circ C$ 灭菌 20~30 min 后,接入 4% 的酵母菌,在 $150 r \cdot min^{-1}$, $30^\circ C$ 条件下摇床培养。每隔 12 h 取样,离心后得到上清液,在 752 紫外光栅分光光度计上采用 4-氨基安替比林分光光度法(560 nm)测定

上清液苯酚浓度^[8];使用日本岛津公司 TOC-5000 型总有机碳分析仪测定上清液 TOC;同时用 752 紫外光栅分光光度计测定菌悬液的 OD_{500} 。血球计数法计数酵母菌个体,由单个酵母细胞干重 $1.45985 \times 10^{-11} g$ 计算酵母菌液中总生物量。

2 结果与讨论

2.1 初始苯酚浓度对苯酚降解率和酵母 OD_{500} 的影响

不同初始苯酚浓度对酵母菌降解苯酚的影响见图 1~图 2。当初始苯酚浓度为 $559.0 mg \cdot L^{-1}$ 时,初始 40 h 内苯酚降解率在 90% 以上,50 h 后苯酚完全被降解;而初始苯酚浓度为 $931.7 mg \cdot L^{-1}$ 时,50 h 后只降解了 39.8%,酵母菌生长缓慢,苯酚降解亦缓慢,苯酚完全降解需 170 h。由此可见,初始苯酚浓度升高会降低酵母菌降解苯酚的效率。比较苯酚降解率和菌悬液的 OD_{500} 可以发现,苯酚的降解同酵母菌的生长有很大的相关性。苯酚降解率高时,菌体 OD_{500} 增加快,反之亦然。苯酚完全降解后,酵母菌 OD_{500} 维持稳定。

氮、磷营养盐对酵母菌降解苯酚亦有影响。从图 2 发现,在相同酵母接种量时,对于初始苯酚浓度为 $745.4 mg \cdot L^{-1}$ 的培养液,由于其 C:N:P 为 40:4:5 (摩尔浓度比),苯酚降解 50% 大约需要 108 h;而对初始苯酚浓度为 $931.7 mg \cdot L^{-1}$ 的培养液,尽管苯酚含量高,但由于其 C:N:P 提高到 30:4:5 (摩尔浓度比),

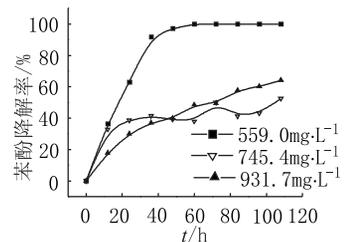


图 1 初始苯酚浓度对苯酚降解率的影响

Figure 1 Effect of initial phenol concentration on phenol degradation

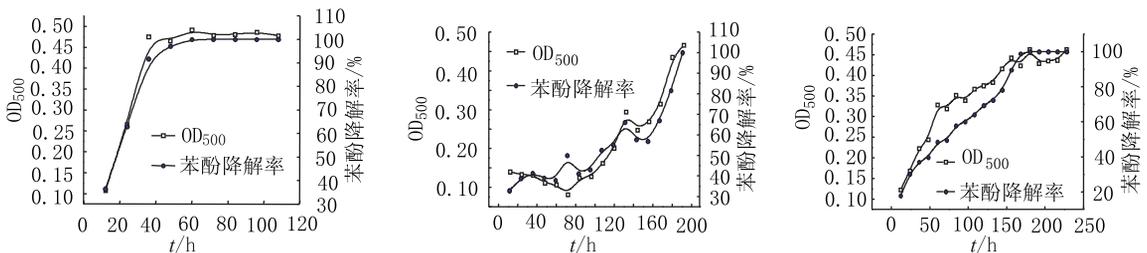


图 2 初始苯酚浓度为 $559.0 mg \cdot L^{-1}$ 、 $745.4 mg \cdot L^{-1}$ 、 $931.7 mg \cdot L^{-1}$ 的培养液中苯酚降解率同酵母 OD_{500} 随时间的变化过程

Figure 2 Change of phenol degradation and yeast's OD_{500} for initial phenol concentration

of $559.0 mg \cdot L^{-1}$, $745.4 mg \cdot L^{-1}$, $931.7 mg \cdot L^{-1}$

其苯酚降解 50% 所需时间大约 72 ~ 84 h, 因此, 提高氮、磷含量能加快酵母菌对苯酚的降解。比较图 2 发现, 在 C: P: N 都为 30: 4: 5 (摩尔浓度) 时, 苯酚的降解效率同初始苯酚浓度有关, 初始苯酚浓度低, 苯酚完全被酵母降解所需时间短。

2.2 初始苯酚浓度对酵母生物量的影响

不同初始苯酚浓度下通过计数得到的酵母总生物量的变化过程如图 3 所示。比较图 2 与图 3 可以发现, 酵母的生物量和 OD₅₀₀ 有很好的相关性, 只有在酵母菌的衰亡期, 酵母菌的生物量出现下降的趋势。氮磷比例低, 酵母生长的延滞期较长。

2.3 初始苯酚浓度对 TOC 去除的影响

瓶形酵母菌降解苯酚时, 主要通过好氧降解。苯

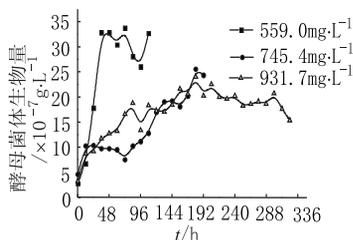


图 3 苯酚浓度对酵母菌生物量的影响

Figure 3 Effect of phenol concentration on yeast biomass

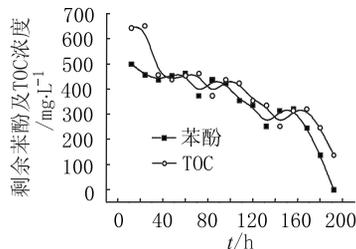
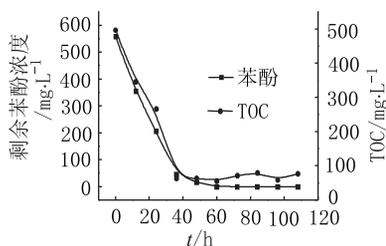


图 4 初始苯酚浓度为 559.0 mg · L⁻¹, 745.4 mg · L⁻¹ 的培养液中苯酚降解率和 TOC 随时间变化过程

Figure 4 Change of phenol degradation rate and TOC for initial phenol concentration of 559.0 mg · L⁻¹, 745.4 mg · L⁻¹

表 1 对照组酵母蒸馏水体系 TOC 随时间的变化

Table 1 Change of TOC degradation in the control experiment of distilled water

时间/h	0.17	0.5	2	6	9	12	24	36	48
TOC/mg · L ⁻¹	46.8	48.4	49.4	32.1	13.4	15.2	9.2	12.3	10.3

需时间增加, 酵母干重增加量减少, 其转化率降低。初始苯酚浓度为 559.0 mg · L⁻¹ 的培养液中, 降解 90% 苯酚对应酵母干重增加量为 300.6 mg · L⁻¹; 而初始

表 2 苯酚浓度对酵母转化率的影响

Table 2 Effect of phenol concentration on yeast biomass

苯酚浓度/mg · L ⁻¹	降解 90% 苯酚所需时间/h	酵母总干重/mg · L ⁻¹	酵母净干重/mg · L ⁻¹	转化率/%
559.0	36	328.2	300.6	58.6
745.4	180	256.0	209.6	35.2
931.7	156	215.8	184.0	21.9

环不断开环断裂生成乙酸, 进入三羧酸循环被彻底氧化为 CO₂ 和 H₂O。本研究亦旨在跟踪酵母菌降解苯酚过程中有机物的变化。测定酵母菌降解过程中 TOC 的变化比 BOD 或 COD 更准确反映总有机物的含量^[9, 10]。

初始苯酚浓度为 559.0 mg · L⁻¹ 和 745.4 mg · L⁻¹ 的培养液中 TOC 降解过程见图 4。初始苯酚浓度为 559.0 mg · L⁻¹ 的培养液中, 苯酚迅速被降解的同时 TOC 亦迅速下降, 两者几乎是平行的。直到苯酚完全降解后, 两者的 TOC 才保持一定的浓度, 但是其去除率也分别为 88% 和 80%。为了了解酵母对 TOC 的影响, 4% 接种量的酵母转接到相同体积无菌蒸馏水中观察 TOC 的变化, 在最初 2 h 之内, TOC 由 46.8 mg · L⁻¹ 上升到 49.4 mg · L⁻¹, TOC 的增加可能来自酵母细胞生命活动的代谢产物或者是原培养液的残留有机物。6 h 之后 TOC 迅速下降, 48 h 之后菌悬液 TOC 为 10.3 mg · L⁻¹。由此可推测, 酵母降解苯酚过程中, 基本没有中间代谢产物从酵母细胞中分泌出来, 见表 1。

2.4 初始苯酚浓度对酵母转化率的影响

不同初始苯酚浓度培养液中酵母菌体生物量及转化率见表 2。初始苯酚浓度增加, 降解 90% 苯酚所

苯酚浓度为 745.4 mg · L⁻¹ 的培养液中, 酵母增加量显著减少; 初始浓度为 931.7 mg · L⁻¹ 的培养液中, 酵母干重增加量略低于初始苯酚浓度为 745.4 mg · L⁻¹ 的培养液。因此, 初始苯酚浓度是限制酵母细胞生物量增加的主要因子。

3 结论

酵母菌降解苯酚的过程中, 苯酚浓度的变化同醇

母菌菌体生物量有极大的相关性, 初始苯酚浓度增加, 相同条件下完全降解苯酚所需时间增加。提高氮磷比例将促进酵母对苯酚的降解, 但对酵母生物量的转化无明显促进作用。培养液中 TOC 的降低同剩余苯酚浓度一致; 初始苯酚浓度为 $559.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中, 苯酚完全降解时 TOC 去除率达 88% 以上; 初始苯酚浓度为 $745.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中, 苯酚完全降解时 TOC 去除率约为 80%。降低初始苯酚浓度可以增加酵母细胞生物量的转化率。

参考文献:

- [1] 刘琼玉, 李太友. 含酚废水的无害化处理技术进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002(2): 62 - 66.
- [2] Banat F A, Al - Bashir B, Al - Asheh S, et al. Adsorption of phenol by bentonite[J]. *Environ Pollut*, 2000, 107: 391.
- [3] Dutta N N, Brothakur S, Baruah R. A novel process for recovery of

phenol from alkaline wastewater: laboratory study and predesign cost estimate[J]. *Water Environ Res*, 1998, 70: 4.

- [4] 关贵兰. 利用淀粉废水生产单细胞蛋白(SCP)的研究[J]. 淀粉与糖, 1996, 4, 35 - 40.
- [5] 赵 东, 唐万裕, 龙 萍. 利用酒厂废水生产单细胞蛋白的研究[J]. 酿酒技术, 1992, 4: 70 - 73.
- [6] 刘 军. 从柠檬酸发酵液中提取单细胞蛋白的研究[J]. 食品科学, 1999, 8: 47 - 48.
- [7] 张永明, 俞俊堂, 王建龙. 处理啤酒洗糟废水同时生产单细胞蛋白[J]. 环境科学, 2000, 5: 97 - 99.
- [8] 南京大学环境科学环境生物学教研室. 环境生物学实验技术与方法[M]. 南京: 南京大学出版社, 1989. 155 - 156.
- [9] 孙宗光, 齐文启, 付德黔. 总有机碳的测定及其在环境监测中的应用[J]. 现代科学仪器, 1998, (6): 45 - 48.
- [10] 城市供水行业 2000 年技术发展规划[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1993.