

紫外诱变酵母菌利用餐饮废水油脂制取生物柴油

柴宝华^{1,2,3}, 王 怡^{1,2,3}, 王文怀^{1,2,3}, 范 攀^{1,2,3}

(1. 西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055; 2. 西安建筑科技大学
陕西省环境工程重点实验室, 陕西 西安 710055; 3. 西安建筑科技大学 西北水资源与
环境生态教育部重点实验室, 陕西 西安 710055)

摘 要: 基于解脂耶氏酵母菌能够利用疏水基质作为碳源在胞内积累油脂的特点,通过紫外诱变提高其脂质积累能力,并将其用于模拟餐饮含油废水的处理,最终将积累的酵母菌用于生物柴油的制取。试验结果表明,在照射功率为 15 W、波长为 257.3 nm 的紫外诱变条件下,通过照射不同的时间,获得了高产油酵母菌 YL13,将其在产油培养基中培养 7 d 后的生物量浓度、脂质产量、生物柴油产量分别为未诱变菌的 1.43、1.66 和 1.79 倍。将诱变培养的 YL13 用于含 20 g/L 油脂的模拟餐饮废水处理时,7 d 后对油脂的去除率达到 71%,且生物柴油的产量达到 2.01 g/L。可见,通过紫外诱变的解脂耶氏酵母菌可以利用餐饮废水中的油脂,在降低废水中油脂浓度的同时能够通过酵母菌的脂质积累制取生物柴油。

关键词: 解脂耶氏酵母菌; 紫外诱变; 脂质积累; 生物柴油; 餐饮废水

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)21-0113-05

Biodiesel Production by UV Mutagenesis Yeast Feeding Catering Wastewater

CHAI Bao-hua^{1,2,3}, WANG Yi^{1,2,3}, WANG Wen-huai^{1,2,3}, FAN Pan^{1,2,3}

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 3. Northwest China Key Laboratory of Water Resources and Environment Ecology, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Lipid accumulation ability of *Yarrowia lipolytica* (YL) was enhanced by ultraviolet mutagenesis based on characteristics that YL could utilize hydrophobic substrates as the carbon source to accumulate intracellular lipids. The mutagenic YL was then used to treat a simulated catering wastewater and accumulate the lipid for biodiesel production. The results showed that a high-yielding yeast—YL13 was selected after different ultraviolet irradiation time with irradiation power of 15 W and wavelength of 257.3 nm. After being cultured in oil-producing medium for 7 days, the biomass concentration, lipid yield and biodiesel production of YL13 were 1.43 times, 1.66 times and 1.79 times of that of the unmutated yeast, respectively. Moreover, the oil utilization rate reached 71% and the biodiesel yield was 2.01 g/L when YL13 was used for treating simulated catering wastewater with an oil concentration of 20 g/L. The YL mutagenized by ultraviolet radiation could effectively utilize and reduce the oil from the

catering wastewater. Meanwhile, the accumulated lipid by the yeast could be used to produce biodiesel.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; ultraviolet mutagenesis; lipid accumulation; biodiesel; catering wastewater

随着全球能源短缺和环境恶化问题的日益严重,生物柴油作为一种清洁的可再生能源而备受关注。但其昂贵的原料成本严重制约了生物柴油的产业化进程,因此寻求廉价且可持续的原料已经成为生产生物柴油的关键^[1]。与此同时,随着人们生活水平的不断提高,我国餐饮业迅速发展,由此产生了大量餐饮废水。据不完全统计,我国餐饮废水排放量占城市污水排放量的3%,但是BOD₅和COD含量却占总负荷的1/3^[2]。餐饮废水中油脂含量高,直接排放将会对环境造成负面影响^[3]。目前常用的餐饮废水处理方法有物理化学方法(如气浮法、膜分离法、吸附法等)、化学法(如化学絮凝法、化学氧化法等)和生物处理法(如活性污泥法、生物滤池法等)。然而,物化法和化学法均存在成本高、易造成二次污染、适用范围小等缺点^[4]。生物法因处理成本低廉、操作方便而备受青睐^[5],但是由于脂质的油封作用,一般微生物不能直接吸收利用脂质,使得餐饮废水中的油脂降解时间较长^[6]。

解脂耶氏酵母菌是一种产油酵母菌,有报道称其可以利用疏水基质作为碳源进行生长代谢和脂质积累^[7]。因此,笔者在紫外诱变基础上进行筛选,培养获得高脂质积累能力的解脂耶氏酵母菌后,将其应用于模拟餐饮废水中油脂的去除和利用,以期在净化废水的同时实现油脂的资源化,为实现解脂耶氏酵母菌处理或利用餐饮废水并积累胞内脂质用于生物柴油的制取提供重要参考。

1 试验材料与方法

1.1 菌株及培养基

解脂耶氏酵母菌购于陕西省微生物研究所,并保存于-4℃的麦芽汁琼脂固体培养基上。采用YPD培养基活化及分离纯化解脂耶氏酵母菌,其中蒸馏水配制的YPD液体培养基用于活化,加入2.5%的琼脂制成的固体培养基用于分离纯化。

产油培养基用于解脂耶氏酵母菌脂质积累驯化,其成分如下:KH₂PO₄为0.7%、Na₂HPO₄为0.25%、MgSO₄·7H₂O为0.15%、CaCl₂为0.015%、FeCl₃·6H₂O为0.015%、ZnSO₄·7H₂O为0.002%、MnSO₄·H₂O为0.006%、(NH₄)₂SO₄为0.1%、酵

母提取物为0.2%。本试验以20g/L的菜籽油为碳源。此外,以吐温80和聚乙二醇20000作为乳化剂,添加量均为菜籽油质量的10%^[8]。

1.2 菌株的活化和菌悬液的制备

挑取1环解脂耶氏酵母菌接种到YPD液体培养基中,在28℃、160r/min条件下培养1d进行菌株的活化。然后取100mL活化后的菌液,在4000r/min下离心3min后弃去上清液,并用无菌生理盐水洗涤3次,重悬混匀至100mL,制得菌悬液。

1.3 紫外诱变及高脂质含量酵母菌的筛选

将制备好的菌悬液以10%的接种量接种在产油培养基中,在28℃、160r/min条件下培养2d,分别取5mL菌液加入到5个灭菌的培养皿上(规格为Ø90mm),将培养皿置于预热20min、功率为15W的紫外灯下,分别照射0、1、3、5、10min,培养皿与紫外灯的距离为30cm。照射结束后,取不同照射时间下的酵母菌菌液进行稀释涂布并置于黑暗中培养,待长出单菌落后挑选较大的菌落培养1d,将其制备成菌悬液并以10%的接种量接种在产油培养基中,在28℃、160r/min条件下培养2d。

通过测定生物量和脂质含量,筛选出脂质产量较高的酵母菌。由于紫外诱变作用具有不确定性,所以将筛选出来的酵母菌进行多次传代培养,然后进一步对其进行培养。最终筛选出一株稳定且产油高的酵母菌。

1.4 高产油酵母菌处理和利用油脂

模拟餐饮废水中的油脂收集自某厨房的抽油烟机中,其组成中废油浓度为20g/L,其余成分同产油培养基。将筛选出来的高产油酵母菌制备成菌悬液,以10%的接种量接种到模拟餐饮废水中,在28℃、160r/min条件下培养,每天测量生物量浓度、脂质产量、生物柴油产量、废水油脂浓度。

1.5 检测项目及分析方法

1.5.1 生物量浓度及废水油脂浓度的测定

将产油培养基中的发酵液收集于100mL离心管中,在9000r/min下离心5min,将离心后的培养液转移到分液漏斗中,用蒸馏水冲洗细胞2~3次,再用1:1(体积比)的甲醇氯仿冲洗2~3次,将离

心洗涤后的菌在 50 ℃ 下烘干至恒质量,即为生物量。向分液漏斗中加入 30 mL 氯仿溶液,振荡、静置,收集底层氯仿相,重复此操作 3 次。将收集到的氯仿溶液用无水 Na_2SO_4 脱水,旋转蒸发后用 N_2 吹脱至恒质量,即为废水中的油脂量。

1.5.2 酵母菌脂质产量及生物柴油产量的测定

采用酸热耦合超声破碎法提取酵母菌脂质^[9],向所提取的油脂中加入 20 mL 正己烷、40 mL 5% 的硫酸甲醇溶液,在 55 ℃ 下反应 24 h。将生成的脂肪酸甲酯(FAMES)利用气相色谱仪并结合 FID 检测器进行测定^[9]。脂质产量和生物柴油产量分别为单位体积培养液中干菌体可提取的脂质质量及其制取的生物柴油质量;菌体的脂质含量和生物柴油产率分别为单位干菌体质量中可提取脂质的质量百分比及其制取的生物柴油质量百分比。

2 结果与讨论

2.1 解脂耶氏酵母菌的紫外诱变

酵母菌在不同紫外照射时间下发生诱变,诱变后的酵母菌采用平板菌落计数法测定存活率。试验结果表明,在功率为 15 W、反应时间为 10 min 的紫外诱变条件下,随照射时间的增加,酵母菌的存活率呈现先快速下降后缓慢下降的趋势,紫外照射 10 min 时其存活率下降到了 9.93%。

2.2 高产油酵母菌的筛选

2.2.1 酵母菌的脂质产量及生物量浓度

对紫外照射后的菌液稀释涂布培养后,筛选获得了 13 株菌落较大的酵母菌(编号分别为 YL1 ~ YL13)。在产油培养基中培养 2 d,测定其脂质产量。结果表明,与未诱变菌 YL0 相比,诱变菌脂质产量变化很大:5 株发生了负突变,脂质积累能力下降;8 株发生了正突变,脂质积累能力得到了提高。8 株正突变菌株中,YL2、YL3、YL13 的脂质产量分别为 1.70、1.72 和 1.71 g/L,与未诱变菌的 1.21 g/L 相比,分别提高了 1.40、1.42、1.41 倍。因此,紫外诱变可获得 3 株脂质产量提高 40% 以上的解脂耶氏酵母菌(YL2、YL3、YL13)。

筛选出的 3 株解脂耶氏酵母菌经划线分离、传代培养获得的单菌落生物量浓度随培养时间的变化如图 1 所示。可知,YL2、YL3、YL13 的生物量浓度随培养时间均呈现逐渐增大的趋势,第 7 天时生物量浓度分别达到最大值 11.2、10.4 和 11.9 g/L,与未诱变菌的最大生物量浓度 8.3 g/L 相比,其生物

量浓度分别提高了 1.35、1.25、1.43 倍。

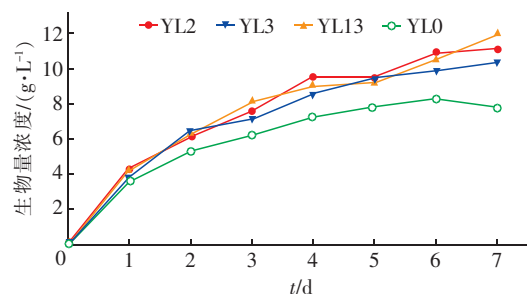


图1 诱变酵母菌生物量的变化

Fig. 1 Change of biomass concentration of mutagenic yeast

2.2.2 解脂耶氏酵母菌的脂质含量及产量

筛选出的 3 株解脂耶氏酵母菌脂质含量及产量的历时变化如图 2 所示。

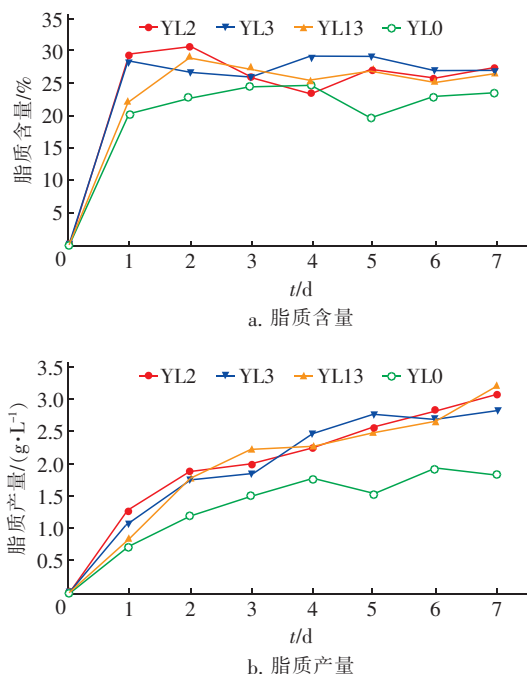


图2 诱变酵母菌脂质含量及产量的历时变化

Fig. 2 Change of lipid content and yield of mutagenic yeast

由图 2(a)可以看出,单位质量干酵母菌积累的脂质含量的变化相似,均呈现出先快速升高然后小幅波动的趋势,YL2、YL3、YL13 在 1 ~ 7 d 的脂质含量均值分别为 $(27.05 \pm 2.4)\%$ 、 $(27.63 \pm 1.3)\%$ 、 $(26.02 \pm 2.2)\%$,与未诱变菌的 $(22.5 \pm 2.0)\%$ 相比提高了 4% ~ 6%。由图 2(b)可以看出,不同诱变酵母菌在 20 g/L 油脂培养条件下单位体积菌液中脂质产量随着培养时间的延长总体呈上升趋势,至 7 d 时均达到最大值,YL2、YL3、YL13 的脂质产量分别达到 3.04、2.81、3.18 g/L,与未诱变菌的最

大脂质产量 1.91 g/L 相比,分别提高了 1.59、1.47、1.66 倍。Sivaramakrishnan 等人^[10]通过紫外诱变和 H_2O_2 处理来提高栅藻的脂质积累能力,结果表明筛选出来的诱变藻与野生藻相比,藻量从 1.9 g/L 提高到了 2.4 g/L,脂质积累能力从 40% 提高到了 55%。Katre 等人^[11]通过化学诱变获得的高产油酵母菌在含有 100 g/L 餐饮废油的培养基中培养,脂质积累量最大可以达到 5.97 g/L,比野生菌提高了 1.86 倍。

2.2.3 以解脂耶氏酵母菌为原料制取生物柴油

图 3 为诱变酵母菌制取生物柴油产率及产量的变化。

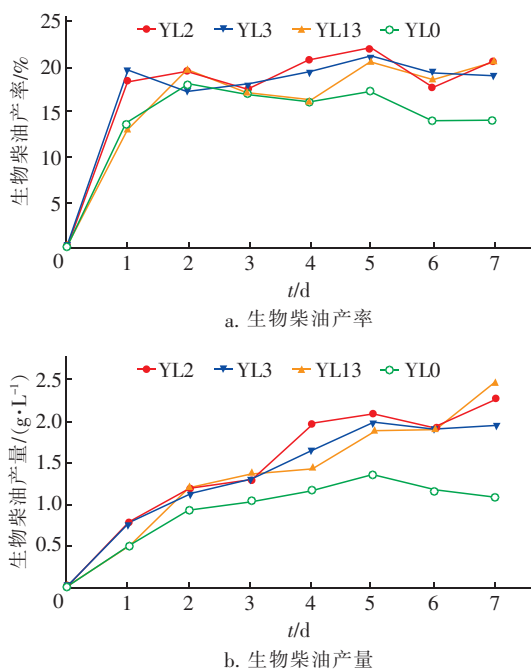


图 3 诱变酵母菌制取生物柴油产率及产量的变化

Fig. 3 Change of biodiesel yield from mutagenic yeast

从图 3(a)可知,不同解脂耶氏酵母菌制取生物柴油的产率变化相似,均呈现先快速升高后小幅波动的趋势。YL2、YL3、YL13 在 7 d 内生物柴油产率均值分别为 $(19.45 \pm 1.7)\%$ 、 $(19.04 \pm 1.2)\%$ 、 $(17.76 \pm 2.7)\%$,比未诱变菌的 $(15.7 \pm 1.8)\%$ 提高了 2% ~ 3%。由图 3(b)可以看出,YL2、YL3、YL13 解脂耶氏酵母菌制取生物柴油的产量随培养时间的延长总体呈上升趋势,7 d 后分别达到最大值 2.28、1.96 和 2.42 g/L,与未诱变菌的最大生物柴油产量 1.35 g/L 相比,分别提高了 69%、45% 和 79%。

综上所述,3 株诱变酵母菌中 YL13 的生物量、

脂质产量以及生物柴油产量均最高,可作为模拟餐饮废水中油脂处理和利用的最佳菌种。

2.3 采用 YL13 处理和利用模拟餐饮废水中的油脂

在处理和利用模拟餐饮废水油脂过程中,YL13 生物量浓度和废水油脂残余浓度的变化如图 4 所示。可以看出,YL13 酵母菌可以利用废水中的油脂进行生物合成,生物量浓度上升的同时油脂浓度下降。7 d 内油脂浓度从 20 g/L 下降到 5.8 g/L,去除率为 71%。与此同时,YL13 生物量浓度在 7 d 内从 0.38 g/L 上升到最大值 10.35 g/L。

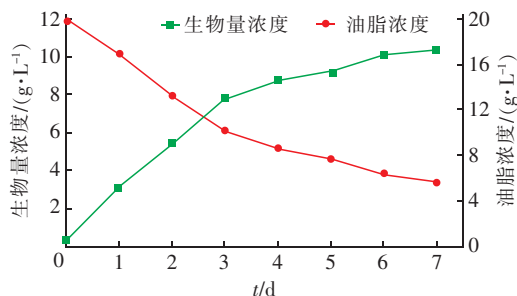


图 4 YL13 利用模拟餐饮废水油脂过程中生物量浓度和油脂浓度的变化

Fig. 4 Change of oil concentration and biomass concentration in catering wastewater by YL13

YL13 利用模拟餐饮废水油脂过程中脂质含量、产量和生物柴油产量、产率的变化如图 5 所示。

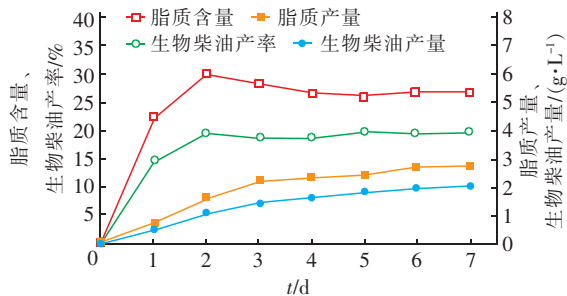


图 5 YL13 利用模拟餐饮废水油脂过程中脂质含量、产量和生物柴油产量、产率的变化

Fig. 5 Change of lipid content and yield, and biodiesel yield in catering wastewater by YL13

从图 5 可以看出,单位质量酵母菌及其制取的生物柴油产率变化趋势类似,均在第 2 天获得最大值,然后小幅下降至平稳状态。酵母菌的脂质含量均值在 2 ~ 7 d 内为 $(27.32 \pm 1.5)\%$,相应的生物柴油产率均值为 $(19.15 \pm 0.5)\%$ 。酵母菌的脂质产量及其制取的生物柴油产量均随时间的延长而增大,第 7 天时达到最大值,分别为 2.76 和 2.01 g/L,

略小于以纯菜籽油为碳源的培养基培养结果,其原因可能是餐饮废油与纯菜籽油的成分有一定差异。

3 结论

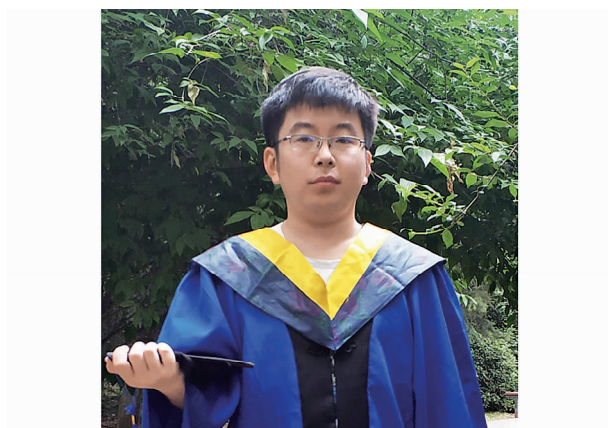
① 通过紫外诱变可以提高酵母菌的脂质积累能力,筛选得到了1株高产油酵母菌 YL13,与未诱变酵母菌相比,最大生物量浓度从 8.3 g/L 提高到了 11.9 g/L,单位体积培养液中酵母菌脂质产量从 1.91 g/L 提高到了 3.18 g/L,单位体积酵母菌制取的生物柴油产量从 1.35 g/L 提高到了 2.42 g/L。

② 将高产油酵母菌 YL13 用于处理和利用脂质浓度为 20 g/L 的餐饮废水时,培养 7 d 后,油脂去除率为 71%,生物柴油产量可达到 2.01 g/L。在处理油脂废水的同时,实现了生物柴油的制取。

参考文献:

- [1] Sahar, Sadaf S, Iqbal J, et al. Biodiesel production from waste cooking oil: An efficient technique to convert waste into biodiesel[J]. Sustainable Cities and Society, 2018, 41: 220–226.
- [2] 周俊, 鄢恒珍, 侯康龙, 等. 固定粒子三维电解法处理餐饮废水的研究[J]. 中国给水排水, 2016, 32(7): 78–81.
Zhou Jun, Yan Hengzhen, Hou Kanglong, et al. Treatment of restaurant wastewater by fixed particle three-dimensional electrode process[J]. China Water & Wastewater, 2016, 32(7): 78–81 (in Chinese).
- [3] Li W, Li Q, Wang Y Y, et al. Efficient bioconversion of organic wastes to value-added chemicals by soaking, black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and anaerobic fermentation[J]. J Environ Manage, 2018, 227: 267–276.
- [4] Yeom H J, Kim S C, Kim Y W, et al. Processing of alumina-coated clay–diatomite composite membranes for oily wastewater treatment[J]. Ceramics International, 2016, 42(4): 5024–5035.
- [5] Dumore N S, Mukhopadhyay M. Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase[J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2012, 68(2): 65–70.
- [6] 张树林, 翁建男, 陈思文, 等. 响应面法优化酵母菌处理餐饮废水[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7): 3141–3146.

- Zhang Shulin, Weng Jiannan, Chen Siwen, et al. Optimizing conditions for treatment of restaurant wastewater by yeasts using response surface methodology[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(7): 3141–3146 (in Chinese).
- [7] Darvishi F, Fathi Z, Ariana M, et al. *Yarrowia lipolytica*, as a workhorse for biofuel production[J]. Biochem Eng J, 2017, 127: 87–96.
- [8] Papanikolaou S, Aggelis G. Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. European Journal of Lipid Science & Technology, 2010, 105(11): 651–655.
- [9] 冯莎. 提高城市污水处理厂污泥制取生物柴油产率的试验研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2015.
Feng Sha. Study on Enhancing Biodiesel Yield from Sludge of Municipal Wastewater Plant[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2015 (in Chinese).
- [10] Sivaramakrishnan R, Incharoensakdi A. Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment [J]. Bioresour Technol, 2017, 235: 366–370.
- [11] Katre G, Ajmera N, Zinjarde S, et al. Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 176.



作者简介: 柴宝华(1994–), 男, 陕西铜川人, 硕士研究生, 主要研究方向为废弃物的资源化利用。

E-mail: chaibh0428@163.com

收稿日期: 2019–04–16